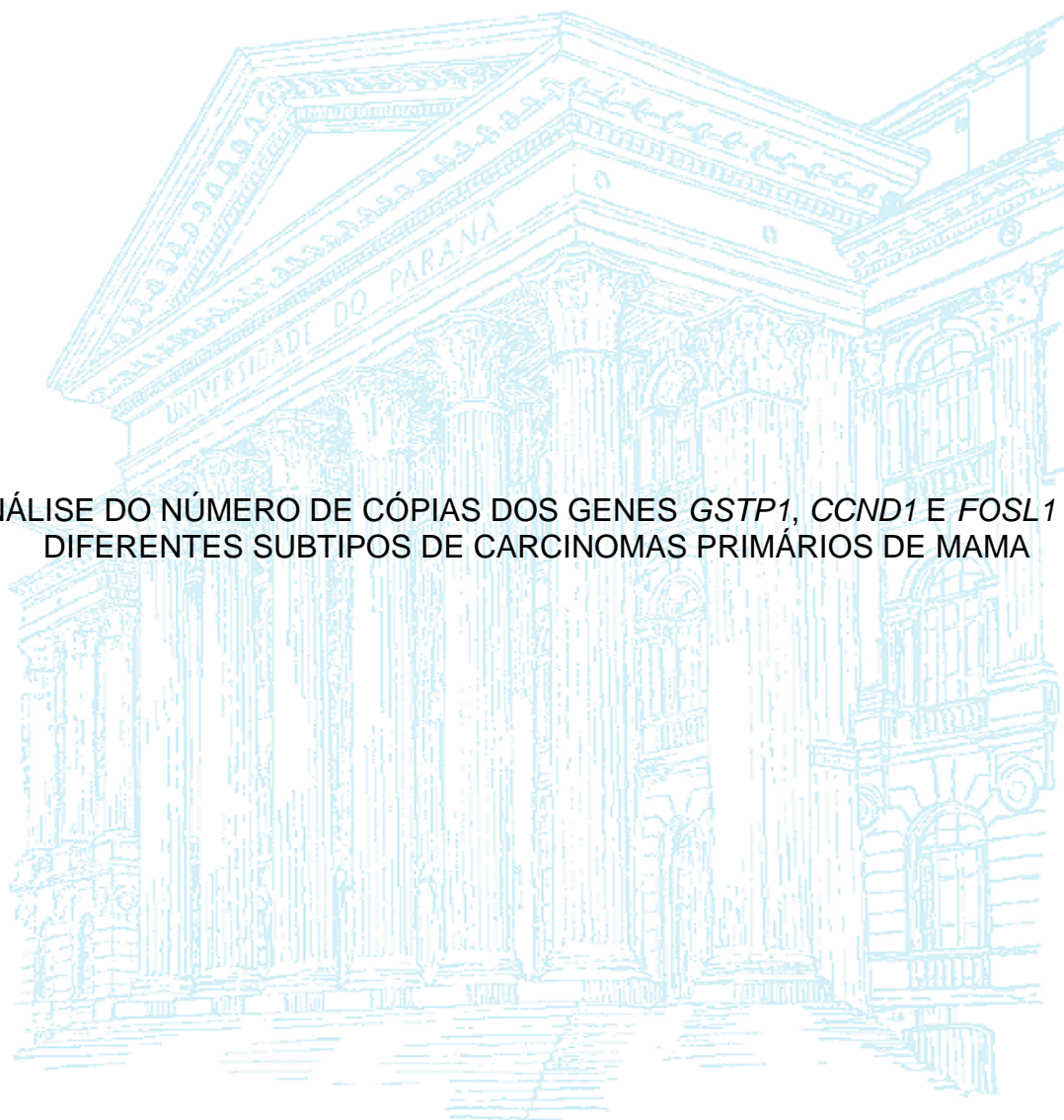


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEANDRO TAMIÃO RODRIGUES SERINO

ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES *GSTP1*, *CCND1* E *FOSL1* EM
DIFERENTES SUBTIPOS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA



CURITIBA

2015

LEANDRO TAMIÃO RODRIGUES SERINO

ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES *GSTP1*, *CCND1* E *FOSL1* EM
DIFERENTES SUBTIPOS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Genética, Setor
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Enilze Maria de
Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir João
Cavalli

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Serino, Leandro Tamião Rodrigues Serino

Análise do número de cópias dos genes GSTP1, CCND1 e FOSL1 em diferentes subtipos de carcinomas primários de mama. / Leandro Tamião Rodrigues Serino. – Curitiba, 2015.

93 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientador: Iglénir João Cavalli

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas - Cancer 2. I. Título II. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca III. Cavalli, Iglénir João IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.99249



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LEANDRO TAMIÃO RODRIGUES SERINO**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de março de 2015

Doutora Sarah Franco Vieira de Oliveira
Universidade Federal da Fronteira Sul – Membro Titular

Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Dedico este trabalho aos meus pais, pois
todo o esforço deles tornou meu sonho
possível. À minha avó Ondina (*in
memoriam*) por todo o cuidado que sempre
teve comigo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof^a. Dr^a. Enilze Ribeiro e ao Prof^o. Dr. Iglénir João Cavalli que durante todo esse tempo que estive no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética me auxiliaram de forma brilhante, estando sempre à disposição para me ajudar em todas as dúvidas que tive. Por me propiciarem a chance de estar em um grupo tão bom quanto este, pela confiança depositada e, principalmente, pela amizade.

À Prof^a. Dr^a. Roseli Wassem, por fazer parte da banca de acompanhamento. À Dr^a. Sarah Franco Vieira de Oliveira, por ter aceitado ser parte da banca de defesa, e por ter sido a pessoa que me ensinou muito quando ingressei no laboratório, 5 anos atrás. Ao Prof^o. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, por constituir ambas as bancas. Obrigado a todos pela disponibilidade e a dedicação para contribuir com sugestões ao trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, pelas conversas, festas e bons momentos vividos no ambiente de trabalho. Em especial ao Gustavo por todas as conversas (que normalmente se transformam alguma piadinha) e pelo grande amigo que é. À Cí que além de amiga, se tornou minha professora de dança (algo que nunca pensei que fosse fazer). E à Talita, que desde o primeiro dia da graduação se tornou uma pessoa muito especial e que eu sei que posso contar sempre. A amizade de vocês foi e sempre será muito importante!

Aos meus pais João e Odete e, meu irmão Douglas por serem os responsáveis por eu estar aqui e por sempre acreditarem em meus sonhos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Deus, pois Ele sempre está ao nosso lado!

*“A ciência nunca resolve um
problema sem criar pelo menos
outros dez.”*

George Bernard Shaw

RESUMO

O câncer de mama é uma das principais causas de morte nas mulheres em todo o mundo, sendo este tipo de câncer o mais incidente na população feminina, desconsiderando o de pele não melanoma. Os tumores mamários são divididos em diferentes subtipos de acordo com o padrão de expressão gênica, no entanto, na prática laboratorial, usa-se a imuno-histoquímica como forma de classificação, baseando-se no *status* dos receptores hormonais e do HER2, subdividindo os tumores nos subtipos Luminal A, Luminal B, HER2⁺ e Triplo-Negativos. A região cromossômica 11q13 é comumente encontrada amplificada em tumores de mama e os genes *FOSL1*, *GSTP1* e *CCND1*, localizados nesta região, têm sido apontados como genes alvos para a iniciação e progressão tumoral. Com o objetivo de avaliar a presença ou ausência de alteração do número de cópias dos referidos genes de acordo com os subtipos de tumores de mama, 77 amostras foram analisadas, sendo 26 luminal A, 29 luminal B, 10 HER2⁺ e 12 triplo-negativas. Verificamos que houve ganho de cópias nos três genes analisados, sendo 70% para o *FOSL1*, 23% para o *GSTP1* e 26% para o *CCND1*. Através do teste de *Kruskal-Wallis*, observamos que *FOSL1* foi o único gene que apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre os subtipos de tumor, tendo maior número de cópias os tumores triplo-negativos em relação aos luminais A e B. Pelo teste de regressão linear, foi possível observar que a alteração do número de cópias deste gene é dependente do subtipo de tumor ($b = 0,79 \pm 0,20$; $t = 3,95$; $p < 0,001$) e independente das alterações nos outros dois genes. Análises de alteração do número de cópias de acordo com os parâmetros clínicos e histopatológicos não apresentaram diferença estatisticamente significativa para nenhum dos genes. Em conclusão, a alteração observada no gene *FOSL1* sugere que este é um potencial marcador prognóstico e para a diferenciação dos subtipos de tumores.

Palavras-chave: Câncer de mama. *FOSL1*, *GSTP1*, *CCND1*. Subtipo tumoral. Número de cópias de DNA.

ABSTRACT

Breast cancer is a leading cause of death in women worldwide. This type of cancer is the most frequent in the female population, after non-melanoma skin cancer. Mammary tumors are divided into subtypes according to the pattern of gene expression, however, in the laboratory routine, it is used a immunohistochemistry classification, based on the hormonal receptor and HER2 status, thus subdividing the tumors in subtypes Luminal A, Luminal B, HER2⁺ and triple-negative. The 11q13 region is commonly found amplified in breast tumors. *FOSL1*, *GSTP1* and *CCND1* genes are located in this region, and have been identified as target genes for tumor initiation and progression. Aiming to evaluate the copy number of these genes according to the subtypes of breast tumors, 77 samples were analyzed, 26 out of those were luminal A, 29 luminal B, 10 HER2⁺ and 12 triple-negative. We found gain in the copy number in all genes analyzed, 70% for *FOSL1*, 23% for *GSTP1* and 26% for *CCND1*. Through Kruskal-Wallis test, we found that *FOSL1* was the only one that showed a statistically significant difference ($p < 0.0001$) among tumor subtypes, with more copies in triple-negatives tumors compared to luminal A and luminal B. By linear regression test, we found that the change in the number of copies of this gene is dependent on the tumor subtype ($b = 0.79 \pm 0.20$; $t = 3.95$; $p < 0.001$) and independent of the alterations in the other two genes. Copy number alteration according to the clinical and histopathological parameters showed no statistically significant differences for any of the genes. In conclusion copy number alterations in *FOSL1* suggest that this gene may be a potential prognostic marker and for the differentiation and tumor subtypes.

Keywords: Breast Cancer. *FOSL1*, *GSTP1*, *CCND1*. Tumor subtype. DNA copy number.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTÁGIOS DA TUMORIGÊNESE	20
FIGURA 2 - FIGURA 2 – AS PRINCIPAIS VIAS ATIVADAS PELA FAMÍLIA DA ONCOPROTEÍNA HER.....	26
FIGURA 3 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SUBTIPOS DE TUMORES DE MAMA. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA DE ACORDO COM O STATUS DOS RECEPTORES HORMONAIS E DA ONCOPROTEÍNA HER2.....	28
FIGURA 4 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES (RE, RP, HER2) ENTRE OS DIFERENTES SUBTIPOS DE TUMORES DE MAMA.....	29
FIGURA 5 - SÍTIOS DA PRIMEIRA METÁSTASE EM TUMORES DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS COMPARADOS COM OS TUMORES NÃO TRIPLO-NEGATIVOS.	32
FIGURA 6 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO 11.....	33
FIGURA 7 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO GENE <i>GSTP1</i>	34
FIGURA 8 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO 11.....	35
FIGURA 9 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO GENE <i>CCND1</i>	36
FIGURA 10 - REGULAÇÃO DA TRANSIÇÃO G1/S. SINAIS MITOGÊNICOS PROMOVEM A LIGAÇÃO DA CICLINA D E CDKS 4/6 QUE POR SUA VEZ SEQUESTRAM AS PROTEÍNAS CIP E KIP FACILITANDO A ATIVAÇÃO DO COMPLEXO CICLINA E/CDK2. O COMPLEXO CICLINA D/CDK 4/6 E CICLINA E/CDK2 FOSFORILAM RB	37
FIGURA 11 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO 11.....	38
FIGURA 12 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO GENE <i>FOSL1</i>	39
FIGURA 13 - REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE FOSL1 (FRA1). MAPK ATIVA FATORES DE TRANSCRIÇÃO QUE SE LIGAM AO PROMOTOR DO <i>FOSL1</i> . A LIGAÇÃO DE FOSL1 FOSFORILADA E C-JUN AOS SÍTIOS TER DO PRIMEIRO ÍNTRON, REGULA A TRANSCRIÇÃO DE <i>FOSL1</i>	40

FIGURA 14 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS FOS.	40
FIGURA 15 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FOSL1</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA.	51
FIGURA 16 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>GSTP1</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA.	51
FIGURA 17 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>CCND1</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA.	52
FIGURA 18 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FOSL1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL A.	52
FIGURA 19 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FOSL1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL B.	53
FIGURA 20 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FOSL1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO HER2 ⁺ .	53
FIGURA 21 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FOSL1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS.	54
FIGURA 22 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>GSTP1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL A.	54
FIGURA 23 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>GSTP1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL B.	55
FIGURA 24 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>GSTP1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO HER2 ⁺ .	55
FIGURA 25 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>GSTP1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS.	56
FIGURA 26 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>CCND1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL A.	56
FIGURA 27 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>CCND1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL B.	57

FIGURA 28 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>CCND1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO HER2 ⁺	57
FIGURA 29 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>CCND1</i> POR AMOSTRA DOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS.	58
FIGURA 30 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FOSL1</i> DE ACORDO COM OS SUBTIPOS.	59
FIGURA 31 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FOSL1</i> E RETA DE REGRESSÃO LINEAR DE ACORDO COM OS SUBTIPOS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS.	59
FIGURA 32 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>GSTP1</i> DE ACORDO COM OS SUBTIPOS.	60
FIGURA 33 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>CCND1</i> DE ACORDO COM OS SUBTIPOS.	61
FIGURA 34 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FOSL1</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA QUE APRESENTAM METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.....	62
FIGURA 35 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FOSL1</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA COM AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.....	62
FIGURA 36 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>GSTP1</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA QUE APRESENTAM METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.....	63
FIGURA 37 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>GSTP1</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA COM AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.....	63
FIGURA 38 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>CCND1</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA QUE APRESENTAM METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.....	64
FIGURA 39 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>CCND1</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA COM AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.....	64

FIGURA 40 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* EM PACIENTES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS..... 65

FIGURA 41 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* EM PACIENTES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS..... 65

FIGURA 42 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM PACIENTES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS..... 66

FIGURA 43 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* EM PACIENTES COM TUMORES GRAUS I E II EM RELAÇÃO AOS DE GRAU III. 67

FIGURA 44 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* EM PACIENTES COM TUMORES GRAUS I E II EM RELAÇÃO AOS DE GRAU III. 67

FIGURA 45 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM PACIENTES COM TUMORES GRAUS I E II EM RELAÇÃO AOS DE GRAU III. 68

FIGURA 46 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* EM PACIENTES EM PRÉ-MENOPAUSA E PÓS-MENOPAUSA..... 69

FIGURA 47 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* EM PACIENTES EM PRÉ-MENOPAUSA E PÓS-MENOPAUSA..... 69

FIGURA 48 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM PACIENTES EM PRÉ-MENOPAUSA E PÓS-MENOPAUSA..... 70

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SISTEMA TNM: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS TUMORES DE MAMA UICC/AJCC	19
QUADRO 2 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2014 DO NÚMERO DE NOVOS CASOS DE CÂNCER NO BRASIL, DE ACORDO COM A LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA*	22
QUADRO 3 - CARACTERÍSTICAS DOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA.....	31
QUADRO 4 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES PORTADORAS DE CARCINOMA MAMÁRIO EM CADA SUBGRUPO	48
TABELA 2 - COMPONENTES DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES EM ESTUDO.	50

LISTA DE SIGLAS

AP-1 - *Activator Protein 1*

ATF4 - *Activating Transcription Factor 4*

BRCA1 – *Breast Cancer 1*

BRCA2 - *Breast Cancer 2*

CCND1 – *Ciclina D1*

CDC2 – *Cell division cycle protein 2 homolog*

CDI – *Carcinoma ductal invasor*

CDIS – *Carcinoma ductal in situ*

CDK - *Cyclin-dependent kinases*

CGH – *Comparative Genomic Hybridization*

CI – *Carcinoma invasivo*

CIS – *Carcinoma in situ*

CK – *Citoqueratinas*

CLI – *Carcinoma lobular invasor*

ERE - *Estrogen Response Elements*

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

FOS – *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*

FOSB – *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*

FOSL1 - *Fos-related antigen 1*

FOSL2 - *Fos-related antigen 2*

GSTs – *Glutathione S-Transferases*

GSTP1 - *Glutathione S-transferase pi 1*

HER2 - *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

HNSG – *Hospital Nossa Senhora das Graças*

INCA – *Instituto Nacional de Câncer*

JUN – *Jun proto-oncogene*

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*

PCR – *Reação em Cadeia da Polimerase*

PI3K - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PKA - *Protein Kinase A*

PKC - *Protein kinase C*

PTEN – *Phosphatase and tensin homolog*

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RB1 – Retinoblastoma 1

RE – Receptor de Estrogênio

RNASE P - Ribonuclease P

RP – Receptor de Progesterona

SRE - *Serum Response Elements*

TMA – *Tissue Microarray*

TN – *Triple Negative*

TP53 - Tumor Protein p53

TRE - *TPA Response Elements*

UFPR – Universidade Federal do Paraná

USF1 - *Upstream Stimulating Factor 1*

USF2 - *Upstream Stimulating Factor 2*

ZNF703 – *Zinc finger protein 703*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA	19
2.2 EPIDEMIOLOGIA DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS	21
2.3 FATORES DE RISCO	23
2.4 GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA	24
2.4.1 ONCOGENES	24
2.4.2 GENES SUPRESSORES DE TUMOR	26
2.5 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA MAMÁRIO	27
2.6 GENES <i>GSTP1</i> , <i>CCND1</i> E <i>FOSL1</i>	33
2.6.1 <i>GSTP1</i>	33
2.6.2 <i>CCND1</i>	35
2.6.3 <i>FOSL1</i>	38
3 JUSTIFICATIVA	42
4 OBJETIVOS	43
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5 MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	44
5.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL	48
5.3 EXTRAÇÃO DE DNA	48
5.4 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	49
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6 RESULTADOS	51
6.1 Número de cópias de acordo com os subtipos de carcinomas mamários	51
6.2 PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS	61
6.2.1 PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES	61
6.2.2 GRAU HISTOLÓGICO	66
6.2.3 IDADE	68
7 DISCUSSÃO	71
8 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE	93

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença heterogênea de complexa etiologia que apresenta proliferação descontrolada das células. Desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o tipo mais incidente entre a população feminina. No Brasil, de acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano de 2014 e 2015 são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2014).

Perou *et al.* (2000) e Sorlie *et al.* (2001) classificaram os tumores de mama em cinco grupos, de acordo com o padrão de expressão gênica encontrados nos tumores. Os subtipos apresentados pelo grupo de pesquisa são: Luminal A, Luminal B, Basal, “*normal-like*” e HER2⁺. O subtipo Luminal A apresenta positividade para os receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e negatividade para o *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2), o prognóstico para esse subtipo é favorável e normalmente é utilizada terapia hormonal, sendo a quimioterapia restrita a alguns casos específicos. O subtipo Luminal B apresenta positividade para RE e PR e na maioria das vezes HER2 apresenta-se positivo. O prognóstico é pior quando comparado ao Luminal A, e o tratamento comumente utilizado é a terapia hormonal, quimioterapia e trastuzumab (um anticorpo monoclonal direcionado a este receptor) quando há amplificação de HER2. O subtipo “*normal-like*” apresenta baixa incidência entre todos os tumores de mama. O prognóstico é intermediário entre os subtipos Luminais e o basal. O subtipo HER2⁺ apresenta negatividade para os receptores hormonais e positividade para o receptor HER2. O prognóstico não é favorável e normalmente é utilizado trastuzumab e quimioterapia como forma de tratamento. Os tumores do subtipo basal apresentam negatividade para os três receptores (RE, PR e HER2). Nos dias atuais ainda não está completamente estabelecida todas as diferenças entre os tumores do subtipo basal e os triplo-negativos, visto que ambos são negativos para os receptores em questão. O prognóstico para estes pacientes não é favorável, pois não respondem a terapias hormonais ou ao trastuzumab, sendo a quimioterapia a melhor opção, nesses casos.

O foco desse estudo é analisar a variação do número de cópias de três genes: *Glutathione S-Transferase pi 1* (GSTP1), *Cyclin D1* (CCND1) e *Fos-related antigen 1* (FOSL1) em amostras de carcinomas de mama de acordo com a

classificação imuno-histoquímica (GOLDHIRSCH *et al.* 2011), que considera o *status* dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2, categorizando as amostras nos subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2⁺, e Triplo-negativos. A escolha desses genes teve por base estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa grupo, que auxiliaram na definição de regiões genômicas alteradas nos carcinomas mamários. Uma destas regiões é a 11q13, já descrita como amplificada em vários tipos de câncer. A partir destas informações, selecionamos genes contidos nesta região e com função relevante no câncer como candidatos ao estudo.

O gene *GSTP1*, tem importante função na detoxificação, atuando na fase II metabolismo de xenobióticos. Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (TORRESAN *et al.* 2008) onde analisou-se a existência de associação entre polimorfismos deste gene e a ocorrência de câncer de mama, demonstrando associação positiva com portadores do polimorfismo Ile/Val, que diminui a atividade catalítica da enzima. Neste contexto a alteração do número de cópias deste gene pode ser um mecanismo alternativo para a diminuição da atuação enzimática.

O gene *CCND1* codifica a proteína ciclina-D1 que tem importante função no ciclo celular e seu padrão de expressão e degradação é de vital importância para o correto funcionamento do mesmo. Mutações, amplificações e expressão elevada deste gene são comumente observadas em diversos tipos de cânceres. Em estudo anterior (MAIA, 2014) analisamos a expressão diferencial deste gene entre amostras de carcinomas mamários com e sem metástases em linfonodos axilares, não havendo diferença significativa entre estes grupos, apesar da alta expressão em ambos os grupos. No presente estudo buscou-se avaliar a diferença no número de cópias entre os subgrupos, independente da presença ou ausência de metástases em linfonodos.

O gene *FOSL1* pertence à família *FOS* que é composta por quatro membros. As proteínas codificadas por estes genes formam dímeros com proteínas de outras famílias atuando como fatores de transcrição, como por exemplo *Activator Protein 1* (AP-1). Tais fatores de transcrição estão envolvidos em processos relacionados à diferenciação, proliferação e transformação.

Os dados gerados a partir do presente estudo irão contribuir para um melhor entendimento sobre a relação destes genes com os diferentes subtipos de carcinomas mamários, e se a alteração de número de cópias dos mesmos pode auxiliar na distinção entre os subgrupos do câncer de mama.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

Mais de 95% dos cânceres de mama são de origem epitelial, embora haja diversos tipos histológicos (TOMASKOVIC-CROOK; THOMPSON E THIERY, 2009).

Na maioria dos casos de neoplasias mamárias o início da proliferação celular ocorre em células do revestimento dos ductos e lóbulos mamários, sendo denominados carcinomas ductais e carcinomas lobulares, respectivamente. Há ainda outros tumores de mama menos frequentes, como os mucinosos, medulares, tubulares e papilares (GUIMARÃES, 2008). A primeira lesão que ocorre é a hiperplasia das células epiteliais, que passam a apresentar alterações estruturais, mas não atipia citológica, além disso, apresentam poucas alterações genéticas, e um aumento localizado e autolimitado do número de células de um órgão ou tecido. Em seguida, pode ocorrer a displasia celular, onde as células começam a apresentar atipia, além do aumento nas divisões celulares. As células são normais, mas diferentes daquelas do tecido de origem, por essa razão é considerada uma lesão pré-cancerosa. Conforme a doença progride para a forma de carcinoma *in situ* (CIS), a atipia torna-se mais proeminente, aumentando significativamente a taxa mitótica e o acúmulo de alterações genéticas nas células afetadas. O que diferencia a forma pré-maligna (CIS) da maligna, carcinoma invasivo (CI), é o rompimento da membrana basal pelas células epiteliais (FIGURA 1), possibilitando a invasão da corrente sanguínea e linfática e permitindo a disseminação das células tumorais para os linfonodos e órgãos distantes (TLSTY *et al.*, 2004; INCA, 2012).

A progressão desta doença é muito variável e nem todos os carcinomas *in situ* (CIS) evoluem para o carcinoma invasivo (CI), no entanto, o risco de invasão aumenta em mulheres que apresentam CIS primário (EHAMAN *et al.*, 2009).

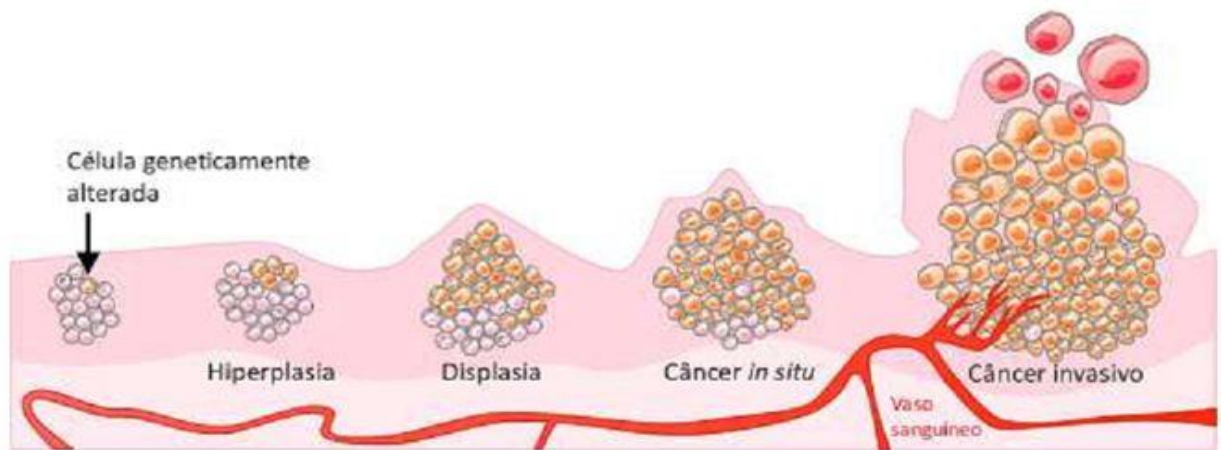


FIGURA 1 - ESTÁGIOS DA TUMORIGÊNESE
FONTE: INCA (2012)

Os carcinomas ductais invasivos (CDI) apresentam maior frequência em relação aos demais tipos, compreendendo de 65% a 80% dos casos de câncer de mama. O carcinoma lobular invasor (CLI) tem incidência de aproximadamente 10% de todos os casos de câncer de mama (EHEMAN *et al.*, 2009).

A classificação dos tumores malignos utiliza o sistema TNM (QUADRO 1) que avalia a doença em três categorias, onde T refere-se à extensão do tumor primário, N referente à ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais e M à ausência ou presença de metástase à distância.

T – Tumor primário
Tx – O tumor primário não pode ser avaliado
T0 - Não há evidência de tumor primário
Tis – Carcinoma <i>in situ</i>
T1 - Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão (dividido em T1mic, T1a, T1b e T1c, conforme o tamanho)
T2 - Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão
T3 - Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4 - Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele (dividido em T4a, b, c, d)
N – Linfonodos regionais

NX - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0 - Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral (ais), móvel(eis)
N2 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es) (dividido em N2a e N2b)
N3 - Metástase nos linfonodos da cadeia mamária interna homolateral
M – Metástase à distância
MX - A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0 - Ausência de metástase à distância
M1 - Metástase à distância (seguida da notação conforme a localização da metástase)

QUADRO 1 - SISTEMA TNM: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS TUMORES DE MAMA UICC/AJCC

FONTE: Adaptado de *TNM – Classification of Malignant Tumours* 7º ed, 2009.

http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=14296&Itemid=428

2.2 EPIDEMIOLOGIA DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente entre a população feminina mundial (desconsiderando o câncer de pele não melanoma), tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. A maioria das mortes por esta doença ocorre em países de baixa e média renda, pelo fato das pacientes serem diagnosticadas em estágios avançados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Aproximadamente 50% dos casos e 58% das mortes ocorrem em países menos desenvolvidos. A incidência varia muito em todo o mundo, com taxas de 19,3 casos novos a cada 100.000 mulheres no Leste da África até 89,7 casos novos a cada 100.000 mulheres na Europa Ocidental (GLOBOCAN, 2012).

Dados recentes do INCA indicam que para os anos de 2014/2015, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de

56,09 casos a cada 100.000 mulheres (QUADRO 2). Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, esse é o tipo câncer mais frequente entre as mulheres das regiões Sudeste (71,18/100 mil), Sul (70,98/100 mil), Centro-Oeste (51,30/100 mil) e Nordeste (36,34/100 mil). Na região Norte, é o segundo tipo mais incidente (21,29/100 mil), sendo o de colo do útero o mais frequente (INCA, 2014).

Mesmo com todos os esforços para o controle da doença, a incidência está crescendo na maioria dos países e as projeções indicam um crescimento ainda maior para os próximos 20 anos (HOWELL *et al.*, 2014). Tal projeção se deve ao fato de na maioria dos países ocorrer um aumento no número de mulheres com os principais fatores de risco para o câncer de mama, como a menarca precoce, idade tardia para a primeira gravidez, poucas gestações e menopausa tardia. Assim como a presença de outros fatores de risco, como a obesidade, consumo de álcool e sedentarismo.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Côlon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

QUADRO 2 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2014 DO NÚMERO DE NOVOS CASOS DE Câncer no Brasil, de acordo com a localização primária*

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

FONTE: INCA (2014)

Dentre os sintomas dessa neoplasia, o mais comum é o aparecimento de nódulo, normalmente indolor, com consistência dura e irregular, mas há outros com aspectos globosos e bem definidos. Há ainda outros sinais que podem indicar a doença, como edemas cutâneos semelhantes à casca da laranja, dor, hiperemia, descamação ou ulceração do mamilo (INCA, 2014).

Quando diagnosticado e tratado precocemente, o câncer de mama apresenta um prognóstico bom. Apesar disso, as taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil, provavelmente porque a doença continua sendo diagnosticada em estágios avançados. Nos últimos 40 anos, a sobrevida vem aumentando nos países desenvolvidos, sendo de 85% em cinco anos, enquanto que, nos países em desenvolvimento é de 50% a 60% (INCA, 2014).

Estratégias de prevenção e detecção precoce são ferramentas de grande importância para a redução da mortalidade decorrente do câncer de mama (CHUN *et al.*, 2009). Estudos envolvendo aspectos epidemiológicos com o auxílio de metodologias moleculares têm fornecido importantes informações para um melhor controle da doença. Os resultados oriundos desses estudos colaboram para a identificação de novos alvos, tanto para a prevenção quanto para os procedimentos terapêuticos (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

2.3 FATORES DE RISCO

As causas que levam ao câncer de mama ainda não são totalmente conhecidas. No entanto, alguns fatores estão relacionados à susceptibilidade à doença. A história familiar é um fator importante principalmente tratando-se de parentes de primeiro grau que são acometidos pela doença antes dos 50 anos, podendo indicar predisposição genética associada a mutações em alguns genes, como é o caso dos genes *Breast Cancer 1* e *Breast Cancer 2* (*BRCA1* e *BRCA2*), que aumentam o risco do desenvolvimento de câncer de mama. No entanto, o total de casos que estão associados ao fator hereditário é de cerca de 5 – 10%. Há ainda fatores relacionados à exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 40 anos. Menarca precoce (antes dos 11 anos de idade), menopausa tardia (após os 50 anos de idade), nuliparidade e terapia de reposição hormonal são também considerados

fatores de risco (INCA, 2014). A influência da terapia de reposição hormonal e do uso de contraceptivos orais ainda é bastante controversa, mas estudos recentes demonstram que na menopausa o uso de estrogênio isolado não aumenta o risco de câncer de mama, o que ocorre com o uso associado de progesterona (ROSSOUW *et al.*, 2013). Contraceptivos orais modernos parecem expor as mulheres a um pequeno aumento do risco de cânceres de mama e fígado, mas reduzem o risco de câncer de ovário, endométrio e colorretal provocando, na estimativa geral, uma diminuição do risco de câncer (BASSUK e MANSON 2014).

2.4 GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer é o resultado de vários passos de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em células normais levando-as a tornarem-se cancerosas. Na maioria das vezes tais alterações levam as células afetadas à morte celular programada, devido ao sistema de defesa que evita que células alteradas se propaguem. No entanto, algumas dessas alterações podem afetar genes envolvidos no reparo do DNA, mobilidade, angiogênese entre outros, que podem levar à formação do tumor.

A instabilidade genômica é uma das primeiras características observadas na formação do tumor, podendo inclusive estar presente em tecidos histologicamente normais. Sendo herdada ou não, a instabilidade genômica leva a alterações, como deleção gênica, amplificação gênica, mutações de ponto e translocação cromossômica (OSBORNE *et al.*, 2004).

2.4.1 ONCOGENES

Os proto-oncogenes são genes envolvidos na progressão do ciclo celular, crescimento e diferenciação celular. Mutações nesses genes podem ativá-los para a forma de oncogenes, que codificam as mesmas proteínas que atuam nas vias que controlam o crescimento celular, incluindo os fatores de crescimento que estimulam a divisão celular, receptores e proteínas citoplasmáticas envolvidas na transdução de sinais e fatores de transcrição (NUSSBAUM *et al.*, 2007), porém de forma exacerbada.

A ativação dos oncogenes pode ocorrer através de amplificação gênica, levando a um aumento da taxa de proteínas codificadas e consequentemente da sua função na célula. Outro mecanismo envolvido na ativação de oncogenes é a mutação de ponto. Um dos primeiros oncogenes descoberto ativado por mutação de ponto foi o *RAS*, através de linhagens celulares de um carcinoma de bexiga. A translocação cromossômica é outro mecanismo envolvido na ativação de oncogenes (OSBORNE *et al.*, 2004; NUSSBAUM *et al.*, 2007).

De acordo com pesquisas recentemente realizadas por Holland *et al.* (2011), o oncogene *Zing Finger Protein 703 (ZNF703)* é comumente encontrado ativado em carcinomas de mama do subtipo luminal B. Uma importante observação gerada pelo mesmo grupo de pesquisa indica que os oncogenes *ZNF703* e *HER2* estão amplificados em aproximadamente dois terços de todos os carcinomas de mama do subtipo luminal B.

A oncoproteína *HER2* pertence a uma família de receptores que desempenham papéis centrais na patogênese de diversos cânceres humanos. São responsáveis por regular o crescimento celular, diferenciação através da transdução de diversos sinais celulares (IQBAL e IQBAL, 2014). A família *HER2* é composta por quatro membros principais: *HER1*, *HER2*, *HER3* e *HER4* (RIESE e STERN, 1998).

Os receptores *HER2* estão presentes na forma de monômeros na superfície celular. Após a ligação de ligantes ao seu domínio extracelular ocorre a dimerização e transfosforilação do seu domínio intracelular. A homodimerização ou heterodimerização de *HER2* resulta na autofosforilação dos resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do receptor e ativa diversas vias de sinalização, incluindo a via *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K)* e a *protein kinase C (PKC)*, resultando em proliferação celular, diferenciação, angiogênese e invasão (IQBAL e IQBAL, 2014). A principal via regulada pelos membros da família *HER* está exposta na FIGURA 2.

HER2 apresenta expressão elevada em torno de 15 – 30% dos carcinomas de mama invasivo. O método clássico de estudo é através da identificação da proteína no tecido tumoral através da imuno-histoquímica. Quando o resultado é duvidoso, ou seja, não é francamente positivo, deve-se proceder à pesquisa de amplificação do gene *HER2* pela hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). As células de câncer de mama podem apresentar até 50 cópias do gene *HER2* e expressão proteica aumentada de até 100 vezes, resultando em um elevado número

de receptores presentes na superfície das células de tumor (KALLIONIEMI *et al.*, 1992.; BURSTEIN, 2005). A amplificação gênica de *HER2* e a expressão aumentada de sua proteína estão associadas a um menor tempo de vida livre da doença, assim como de sobrevida global (IQBAL e IQBAL, 2014).

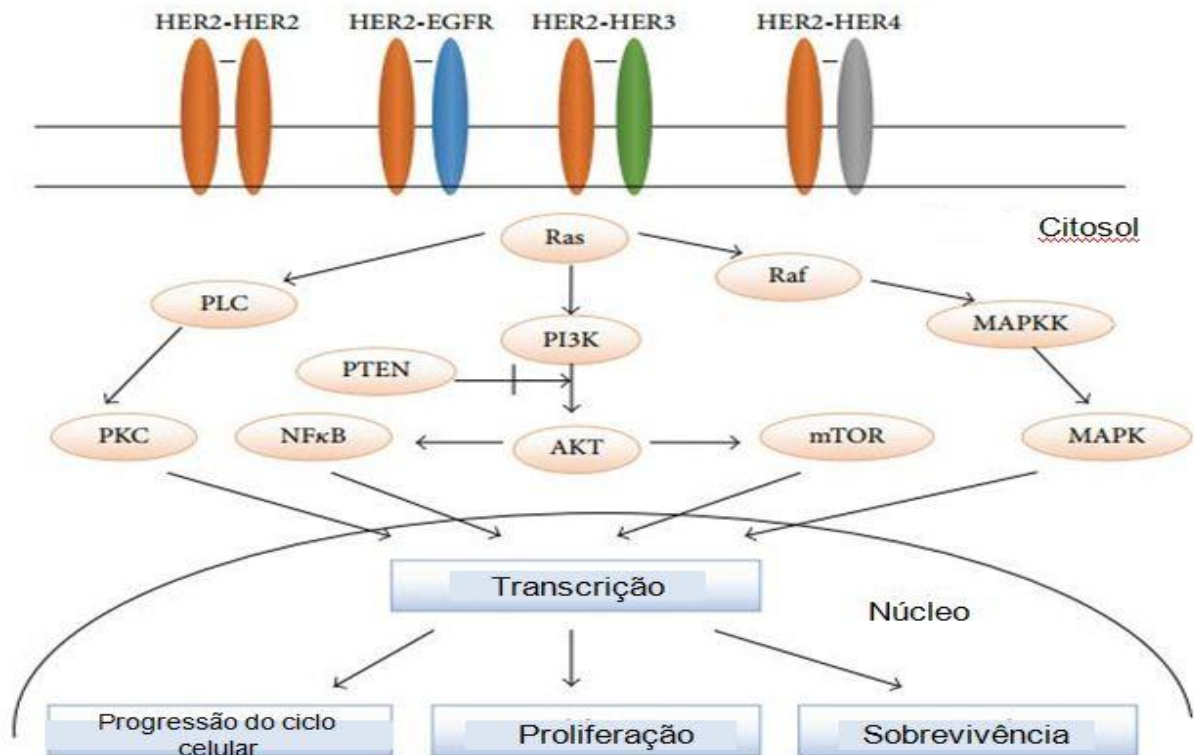


FIGURA 2 - As principais vias ativadas pela família da oncoproteína HER.
FONTE: Adaptado de IQBAL e IQBAL, 2014.

2.4.2 GENES SUPRESSORES DE TUMOR

A classe dos genes supressores de tumor é composta por genes que atuam normalmente regulando negativamente o crescimento celular e outros mecanismos envolvidos na metástase, como a adesão celular e regulando positivamente a apoptose (OSBORNE *et al.*, 2004). A perda de função desses genes pode estar envolvida na formação de tumores, sejam eles hereditários ou esporádicos. Em ambos os casos, o tumor tipicamente contém a mutação em um alelo, resultando na perda de função e a deleção do outro alelo, seguindo a “hipótese dos dois eventos”, proposta por Knudson (1971). Em muitos casos, a inativação desses genes não ocorre devido a uma mutação, e sim outro mecanismo que interfere na expressão

gênica, como é o caso da metilação do DNA, que pode suprimir a transcrição gênica (OSBORNE *et al.*, 2004).

Diversos genes supressores de tumor já foram identificados, tendo como exemplo o *RB1*, *APC*, *TP53*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2* (KOPNIN, 2000; BUNZ, 2008). Os genes supressores de tumor podem ainda ser subdivididos em *caretaker* e *gatekeeper*. Os *caretakers* são genes que atuam como sensores de danos ao DNA e participam de processos de reparo. A inativação destes, leva ao acúmulo de falhas no genoma propiciando instabilidade genética. Como exemplo desses genes, podemos citar o *BRCA1* e *BRCA2*. Os genes *gatekeepers* estão envolvidos no controle da progressão pelo ciclo celular e a inativação destes promove o crescimento tumoral. Exemplos desses genes são *RB1* e *TP53* (OLDENBURG *et al.*, 2007).

Outro mecanismo envolvido na carcinogênese mamária é o epigenético, através do silenciamento da expressão de genes supressores de tumor. O principal mecanismo é a metilação de ilhas CpG de regiões promotoras destes genes (HAAG *et al.*, 2014).

2.5 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA MAMÁRIO

Estudos utilizando técnicas de microarranjos foram realizados para analisar os padrões de expressão gênica e assim redefinir a tradicional classificação, organizando os tumores de mama em diferentes subtipos moleculares. Tais estudos contribuíram para um melhor entendimento da complexidade e heterogeneidade genética entre os tumores mamários (REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011).

A diversidade de expressão gênica de tumores mamários pode estar associada com a sua diversidade fenotípica. Perou *et al.* (2000), analisaram o padrão de expressão gênica de tumores mamários de 42 indivíduos, sendo 36 de carcinomas ductais invasivos (CDI), 2 carcinomas lobulares, 1 carcinoma ductal *in situ* (CDIS), 1 fibroadenoma e 3 amostras de tecido mamário normal. Foram analisados primeiramente 1.753 genes, revelando diferenças entre os tumores, variação na taxa de crescimento, na atividade de sinalizadores de determinadas vias

e na composição dos tumores. A expressão desse grupo de genes variou largamente entre as amostras tumorais, sendo bem correlacionadas com o índice mitótico.

A classificação sugerida por Perou *et al.* (2000) baseia-se em quatro grupos: luminal, basal, *HER2* positivo e “*normal-like*”. Estudos posteriores realizados pelo mesmo grupo demonstraram a divisão do subtipo luminal em dois subgrupos (Luminal A e Luminal B), por apresentarem expressão gênica distinta e diferentes comportamentos clínicos. (FIGURA 3) (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; SANDHU *et al.* 2010).

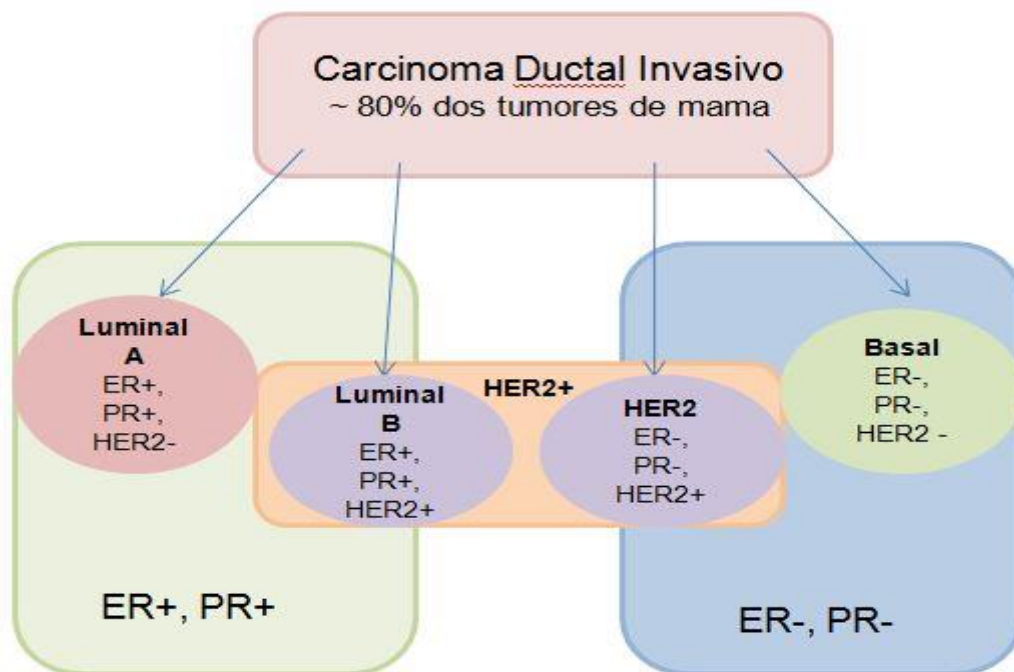


FIGURA 3 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SUBTIPOS DE TUMORES DE MAMA. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA DE ACORDO COM O STATUS DOS RECEPTORES HORMONAIS E DA ONCOPROTEÍNA HER2.
FONTE: Adaptado de SANDHU *et al.*, 2010.

A rotina utilizada para a subclassificação dos carcinomas mamários é realizada através de imuno-histoquímica, corando tecidos tumorais para avaliar a expressão de RE, RP e HER2 (FIGURA 4) (SANDHU *et al.*, 2010). Isso se deve ao fato de a análise do subtipo tumoral por expressão gênica não ser sempre uma alternativa viável, sendo assim, esta classificação simplificada tem sido utilizada (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011).

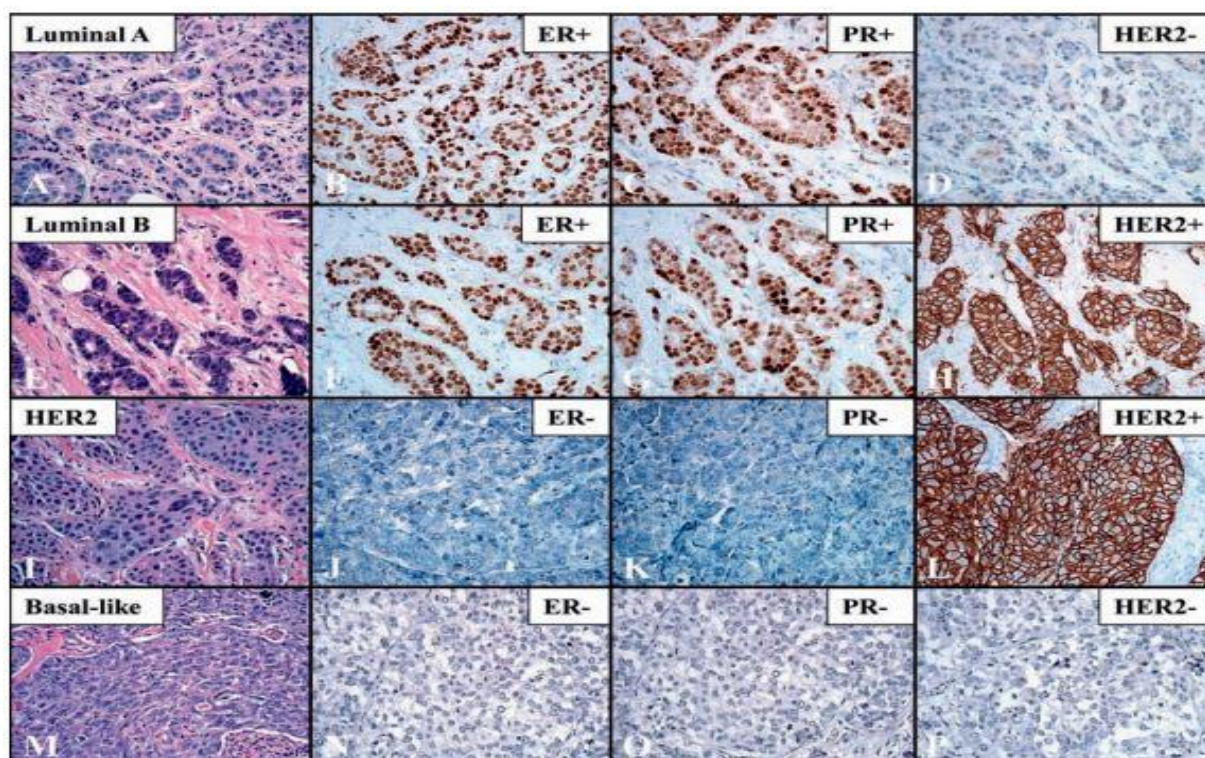


FIGURA 4 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES (RE, RP, HER2) ENTRE OS DIFERENTES SUBTIPOS DE TUMORES DE MAMA.

FONTE: SANDHU *et al.* 2010.

O padrão de expressão dos grupos luminais é semelhante ao do epitélio mamário normal, apresentam positividade para RE e representam 50 a 60% dos carcinomas mamários. Os tumores do subtipo Luminal A apresentam alta expressão de RE e genes relacionados ao RE, além disso, os tumores classificados como sendo Luminal A não possuem amplificação do gene *HER2*, assim como apresentam baixa expressão de genes envolvidos na proliferação celular. Pacientes acometidos por este subtipo apresentam um quadro mais favorável quando comparados aos do subtipo Luminal B (LOI, 2008). Normalmente é utilizado tratamento hormonal para estas pacientes, a quimioterapia é restrita a apenas alguns casos específicos (HARRIS *et al.*, 2007; BURSTEIN *et al.*, 2010; OLSZEWSKI, CHMIELIK e RYS, 2011; GOLDBIRSCH *et al.*, 2011; ALIZART *et al.*, 2012).

O subgrupo Luminal B apresenta elevada expressão de genes envolvidos no ciclo celular e proliferação, além de expressarem a oncoproteína *HER2* (SORLIE *et al.*, 2001). Quando comparados ao grupo Luminal A, o fenótipo é mais agressivo,

apresenta maior grau histológico e taxa de sobrevida menor. As terapias recomendadas são a hormonal e quimioterápica, já nos casos de amplificação de *HER2* é utilizado trastuzumab (HARRIS *et al.*, 2007; BURSTEIN *et al.*, 2010; OLSZEWSKI, CHMIELIK e RYS, 2011; GOLDBIRSCH *et al.*, 2011; ALIZART *et al.*, 2012).

Os tumores do subtipo “*normal-like*” compreendem cerca de 5 a 10% de todos os tumores mamários. Expressam genes característicos de tecido adiposo e apresentam prognóstico intermediário entre o subtipo luminal e basal e normalmente não tem resposta à quimioterapia neo-adjuvante (EROLES, *et al.*, 2012)

Os tumores *HER2+* compreendem cerca de 15% de todos os carcinomas mamários e são caracterizados pela alta expressão de genes relacionados à amplificação do *HER2*, assim como a proliferação celular e negatividade para RE e RP (MARCHIÒ e REISFILHO, 2008). Apresentam também mutações no gene *TP53* em aproximadamente 40% das pacientes. É um tumor de mau prognóstico, sendo recomendada a utilização de trastuzumab e quimioterapia como formas de tratamento (HARRIS *et al.*, 2007; OLSZEWSKI, CHMIELIK e RYS, 2011; GOLDBIRSCH *et al.*, 2011; REIS-FILHO; PUSZTAI, 2011 ALIZART *et al.*, 2012; EROLES *et al.*, 2012).

Os tumores do tipo basal são classificados desta forma por apresentarem algumas características associadas com a camada de células mioepiteliais basais, como a expressão das citoqueratinas 5/6, 14 ou 17, vimentina, laminina e ausência de receptores positivos para estrogênio, progesterona e *HER2* (KIM *et al.*, 2006; LOI, 2008). Estes tumores são melhor classificados através do perfil da expressão gênica (PEROU *et al.*, 2000). No entanto, na prática clínica a imuno-histoquímica se tornou um substituto como forma de classificar os tumores do tipo basal (SANDHU *et al.*, 2010). A correta classificação desses tumores tem grande importância para a clínica, pois permite que sejam indicados tratamentos mais adequados. No âmbito da pesquisa, a subclassificação dos diferentes tipos de tumores é essencial para o entendimento das bases biológicas destes cânceres (SANDHU *et al.*, 2010).

As características dos cinco subtipos estão descritas no QUADRO 3.

Subtipo Molecular	Frequência (%)	ER/PR/ERBB2	CK5/6 EGFR	Genes de Proliferação	Genes Característicos	Grau Histológico	Mutações em TP53	Prognóstico
Basal	10-20	ER-/PR-/ERBB2-	+	Super-expressos	KRT5, CDH3, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2	Alto	Frequentes	Ruim
ERBB2+	10-15	ER-/PR-/ERBB2+	+/-	Super-expressos	ERBB2, GRB7	Alto	Frequentes	Ruim
Normal-like	5-10	ER+/+ ERBB2-	+	Pouco expressos	PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7	Baixo	Poucas	Intermediário
Luminal-A	50-60	ER+/PR+/ERBB2-	-	Pouco expressos	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1	Baixo	Poucas	Excelente
Luminal-B	10-20	ER+/- PR+/- ERBB2+/-	-	Super-expressos	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B	Intermediário /Alto	Intermediário	Intermediário/Ruim

QUADRO 3 - CARACTERÍSTICAS DOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA.

FONTE: Adaptado de EROLES *et al.*, 2012

LEGENDA: Receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), citoqueratinas 5 e 6 (CK5/6), *epidermal growth factor receptor gene* (EGFR), *tumor protein p53 gene* (TP53), positivo (+), negativo (-).

Comumente é utilizado o termo “triplo-negativos” (do inglês, *triple negative*, TN) para classificar os tumores negativos para a expressão dos receptores hormonais (RE, RP) e HER2, sendo que, na maioria são sobrepostos aos tumores do subtipo basal. No entanto, a definição clínica para os tumores TN a partir dos receptores, e o perfil de expressão gênica dos tumores do subtipo basal ainda não está completamente estabelecida.

Pacientes com TN apresentam um pior prognóstico quando comparados a pacientes com outros subtipos de tumores de mama (FOULKES *et al.*, 2010). A taxa mais elevada de recorrência e mortalidade em pacientes com TN pode ser explicada por rotas alternativas de metastatização. De acordo com Hicks *et al.* (2006) os TN metastatizam para os nódulos axilares e ossos menos frequentemente que os demais subtipos de tumores de mama. Tanto TN quanto os tumores do subtipo basal metastatizam mais frequentemente para os pulmões e cérebro (FIGURA 5) (FOULKES *et al.*, 2010).

Pesquisas demonstraram que apenas uma parcela dos tumores TN expressa os marcadores basais das células citoqueratina 5 (CK5) e citoqueratina 14 (CK14) (RODY, *et al.*, 2011). Em um estudo, foi observado que cerca de 70% dos TN se enquadravam no subtipo basal, e 76% dos que pertenciam ao subtipo basal eram TN (PEDDI e ELLIS, 2011).

A grande maioria dos TN apresenta grau elevado, evidente pleomorfismo nuclear, ausência de formação tubular e alta taxa de divisões mitóticas (TURNER e

REIS-FILHO, 2013). Mulheres que apresentam esse subtipo de tumor não respondem favoravelmente a terapias endócrinas ou ao trastuzumab, para estas pacientes, a quimioterapia ainda é o melhor tratamento (FOULKES *et al.*, 2010).

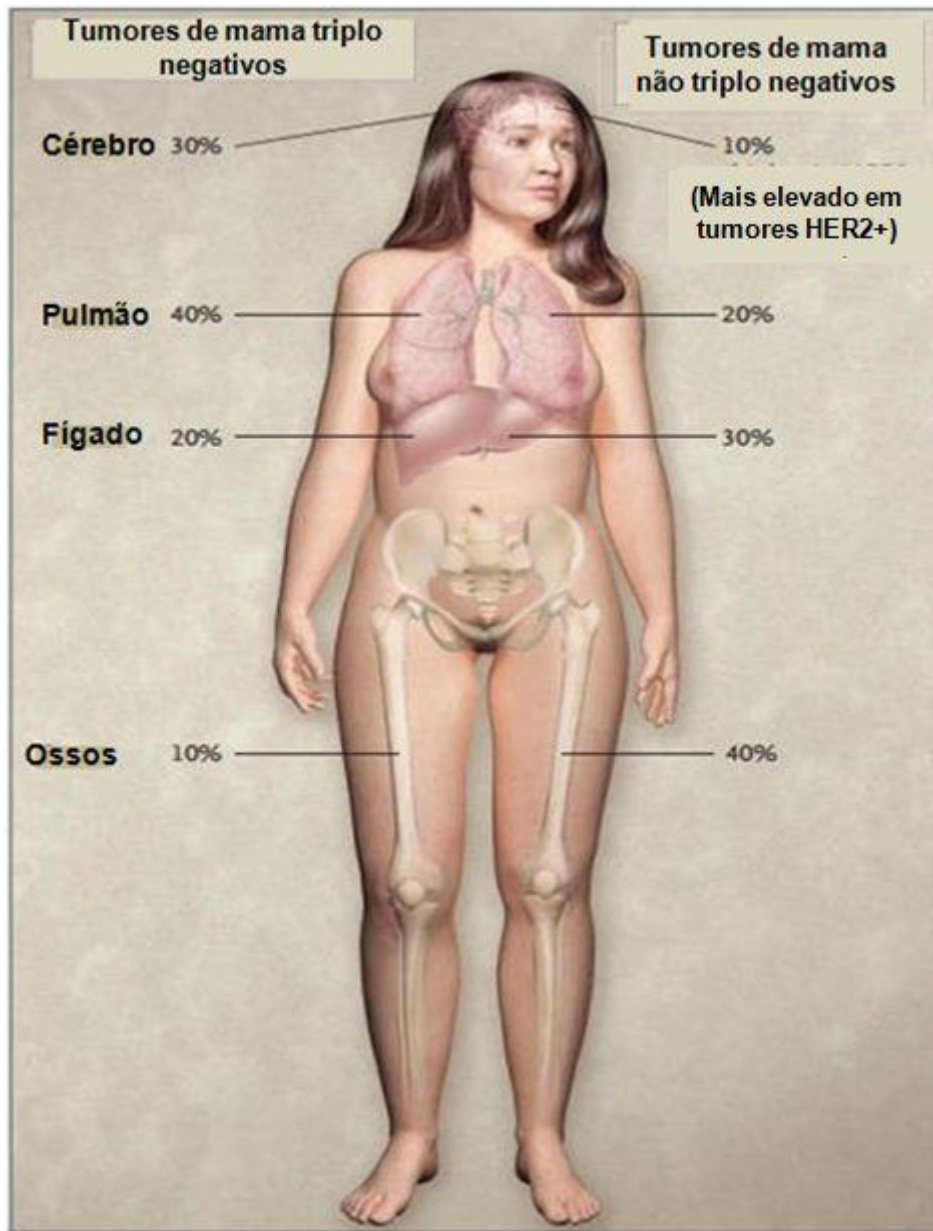


FIGURA 5 - SÍTIOS DA PRIMEIRA METÁSTASE EM TUMORES DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS COMPARADOS COM OS TUMORES NÃO TRIPLO-NEGATIVOS.

LEGENDA: Porcentagens aproximadas dos sítios de aparecimento da primeira metástase.

FONTE: Adaptado de FOULKES *et al.*, 2010.

2.6 GENES *GSTP1*, *CCND1* E *FOSL1*

A região cromossômica 11q13 é frequentemente amplificada em tumores de mama e outras doenças. Tal região possui aproximadamente 14 Mb e contém mais de 200 genes que podem ser afetados pelo ganho de cópias que podem influenciar na progressão tumoral (HOLM *et al.*, 2012). Enfatizaremos os três genes objetos deste estudo.

2.6.1 *GSTP1*

As Glutathionas S-Transferases (GSTs) citosólicas são divididas em 6 classes que em humanos são encontradas em 6 diferentes cromossomos e compartilham aproximadamente 30% de identidade de sequência. As classes são: Alfa (cromossomo 6), Mu (cromossomo 1), Omega (cromossomo 10), Pi (cromossomo 11), Teta (cromossomo 22) e Zeta (Cromossomo 14) (TOWNSEND e TEW, 2003).

O gene Glutathion S-transferase pi 1 (*GSTP1*) está localizado no cromossomo 11q13 e pertence à classe Pi da família das GSTs. O gene possui 7 éxons e 6 íntrons (FIGURA 6 e 7).

As regiões promotoras dos genes da família das GSTs podem conter sítios para a ligação de diversos fatores de transcrição como AP-1, JUN, FOS e MAF. As GSTs possuem capacidade catalítica quando em homodímeros ou heterodímeros, permitindo a formação de diversas enzimas (HAYES e PULFORD, 1995).

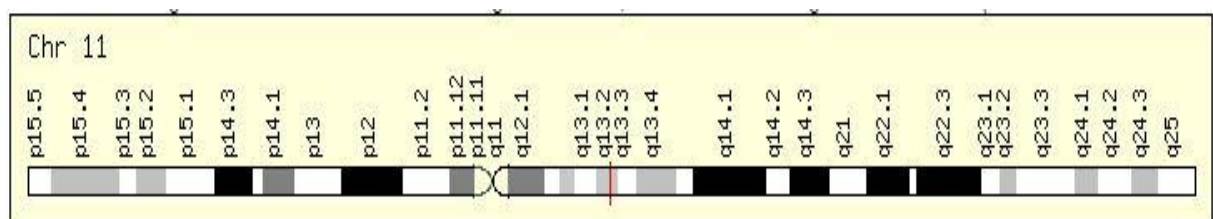


FIGURA 6 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO 11.

LEGENDA: Em vermelho a localização do gene *GSTP1*.

FONTE: <http://www.genecards.org/>

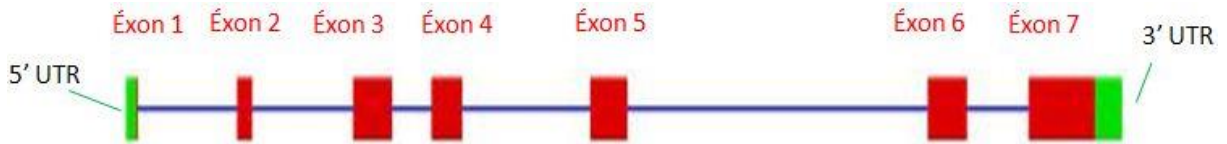


FIGURA 7 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO GENE *GSTP1*.

FONTE: Adaptado de, <http://refgene.com/>

A *GSTP1* pertence a um grupo de enzimas envolvidas na detoxificação (TERRIER *et al.*, 1990). Em tecidos normais essa enzima protege as células contra componentes nocivos catalisando reações de conjugação com a glutathiona reduzida e protege as células contra espécies reativas de oxigênio, reduzindo hidroperóxidos orgânico através da atividade glutathiona peroxidase (BATIST *et al.*, 1986). A baixa atividade de *GSTP1* em linhagens de células T pode favorecer a apoptose (BERNARDINI *et al.*, 2000) e a inibição da mesma induz apoptose em células de carcinoma hepatocelular de ratos (ASAKURA *et al.*, 2001).

Um polimorfismo bastante estudado no câncer e em outras doenças, encontra-se situado no éxon 5 do gene *GSTP1*, e leva à alteração de isoleucina para uma valina no códon 105 (Ile105Val), estando este códon próximo ao sítio de ligação da enzima aos substratos, podendo apresentar alterações da enzima dependendo do substrato com o qual se liga (KHABAZ *et al.*, 2014).

Goto *et al.* (2009) analisaram a localização da proteína *GSTP1* através de imuno-microscopia eletrônica, e verificaram a presença no núcleo, citoplasma e mitocôndrias em linhagens celulares mamárias, indicando que esta proteína possui importante função nessas estruturas.

Vecanova *et al.* (2011) analisaram a positividade de *GSTP1* através de imuno-histoquímica em carcinomas ductais e carcinomas lobulares, e observaram positividade (nuclear e citoplasmática) em 61,8% e 66,7% dos casos, respectivamente. A positividade para *GSTP1* leva a um pior prognóstico de acordo com os dados gerados por Silverstrini *et al.* (1997) e Huang *et al.* (2003), aumentando o risco de recorrência da doença em 6 e 8 vezes, respectivamente.

Howie *et al.* (1989) analisaram a concentração de *GSTP1* em carcinomas de mama que apresentavam positividade ou negatividade para RE, e observaram que a concentração é maior no citosol dos tumores que apresentavam negatividade para RE. Huang *et al.* (2003) observaram um aumento de expressão de *GSTP1* em 58%

dos carcinomas de mama. O mesmo grupo de pesquisa observou que a expressão de GSTP1 não estava relacionada com o *status* do RE.

Análises *in vitro* de linhagens celulares tratadas com quimioterápicos exibiram expressão elevada de GSTP1, indicando que tal gene potencialmente esteja envolvido na resistência de tumores aos tratamentos quimioterápicos (HAYES e PULFORD, 1995).

A resistência à quimioterapia é a principal causa que leva ao fracasso das terapias contra o câncer e sendo a GSTP1 uma das responsáveis pelos processos de detoxificação, sugere-se que sua atividade possa ser um dos mecanismos que contribua para a resistência às drogas (HUANG *et al.*, 2003).

2.6.2 CCND1

A ciclina D1 é uma proteína codificada pelo gene *CCND1* que está localizado no cromossomo 11q13, possui 5 éxons e 4 íntrons (FIGURAS 8 e 9). Tal proteína tem um importante papel na regulação do ciclo celular, controlando a transição entre as fases G1/S (LIU *et al.*, 2014).

O gene *CCND1* apresenta ganho do número de cópias em aproximadamente 15 a 20% dos cânceres de mama (GILLETT *et al.*, 1994; HUI *et al.*, 1997; HUI *et al.*, 1998 ORMANDY *et al.*, 2003; KIRKEGAARD *et al.*, 2008; HOLM *et al.*, 2012). Entretanto, a ciclina D1 apresenta expressão proteica e de mRNA elevada em aproximadamente 50% dos tumores de mama, independentemente de amplificação gênica, sugerindo que possa haver outro mecanismos envolvido na sua desregulação gênica (BUCKLEY *et al.*, 1993; GILLETT *et al.*, 1994; HOLM *et al.*, 2012). Aparentemente, a expressão elevada de *CCND1* ocorre em tumores positivos para RE (HUI *et al.*, 1997; HUI *et al.*, 1998).

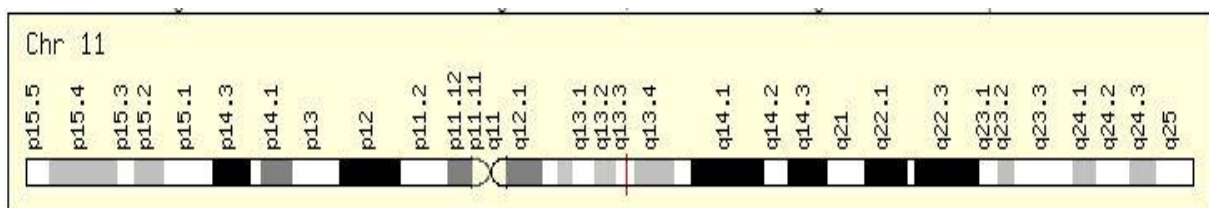


FIGURA 8 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO 11.

LEGENDA: Em vermelho a localização do gene *CCND1*.

FONTE: <http://www.genecards.org/>

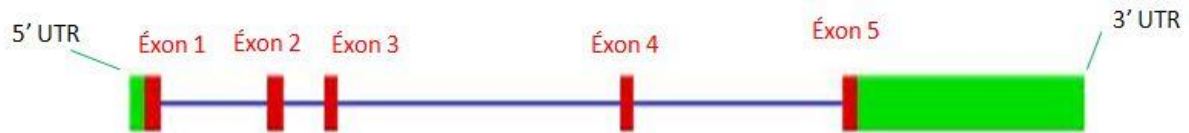


FIGURA 9 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO GENE *CCND1*.

FONTE: Adaptado de, <http://refgene.com/>

O modelo clássico de ação do 17β -estradiol (E_2) envolve a ligação aos receptores de estrogênio nucleares $ER\alpha$ e $ER\beta$, que interagem diretamente com os *Estrogen Response Elements* (ERE) nos promotores de genes alvos, recrutando diversos co-ativadores que medeiam a regulação transcricional (McDONNEL e NORRIS, 2002).

O ciclo celular tem sido alvo de estudos para que se tenha um melhor entendimento sobre os efeitos do estrogênio e seus receptores na proliferação e diferenciação (DOISNEAU-SIXOU *et al.*, 2003).

A p16-ciclinaD1-CDK4 é a via central que regula a transição da fase G1-S do ciclo celular (FIGURA 10) e alterações em componentes dessa via são encontradas na maioria dos tumores, sendo a ciclina D1 a mais comumente alterada (MOTOKURA *et al.*, 1991; JIANG *et al.*, 1992; SCHUURING *et al.*, 1992).

O tratamento de carcinomas mamários com anti-estrogênio inibe a fosforilação da proteína pRB, produto do gene do retinoblastoma, (*RB*) (WATTS *et al.*, 1995) ao passo que o estrogênio induz significativamente a fosforilação deste gene, que é substrato dos complexos ciclinas-CDKs (ALTUCCI *et al.*, 1996; FOSTER e WIMALASENA 1996).

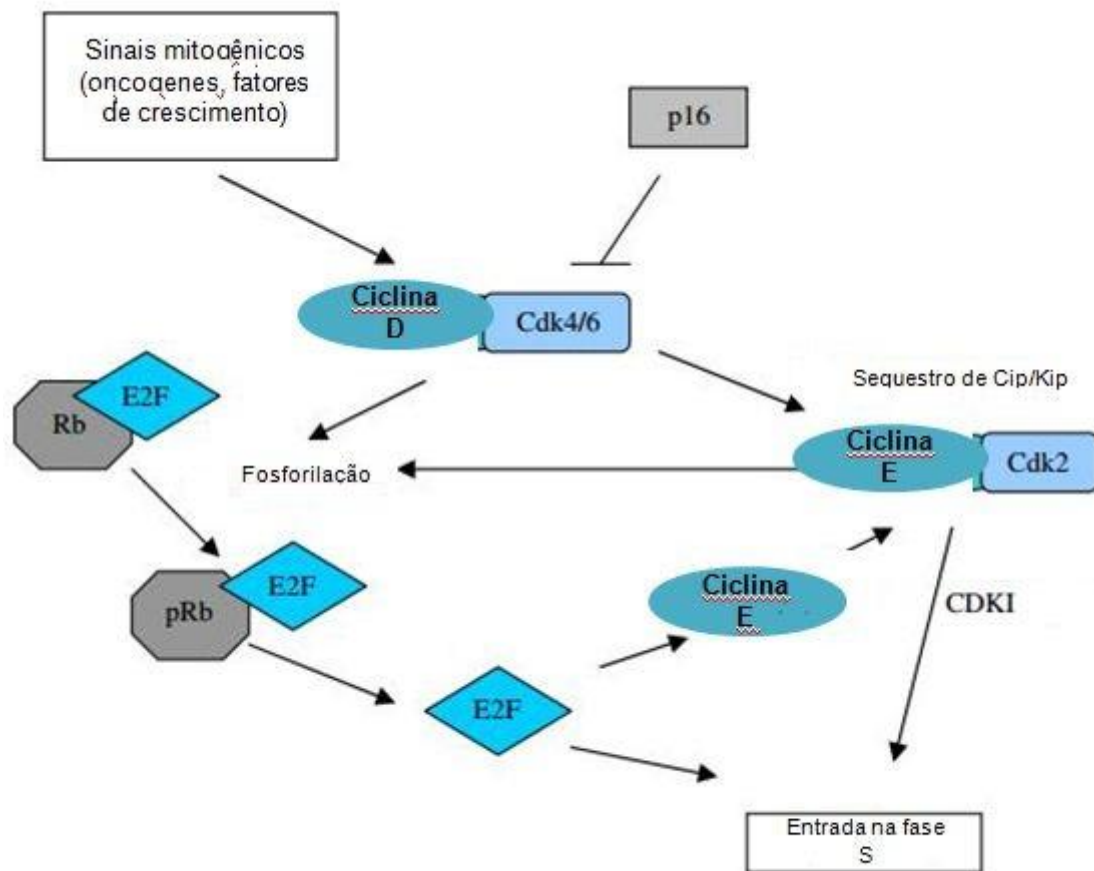


FIGURA 10 - REGULAÇÃO DA TRANSIÇÃO G1/S. SINAIS MITOGÊNICOS PROMOVEM A LIGAÇÃO DA CICLINA D E CDKS 4/6 QUE POR SUA VEZ SEQUESTRAM AS PROTEÍNAS CIP E KIP FACILITANDO A ATIVAÇÃO DO COMPLEXO CICLINA E/CDK2. O COMPLEXO CICLINA D/CDK 4/6 E CICLINA E/CDK2 FOSFORILAM RB
 FONTE: Adaptado de PANKAJ e ALASTAIR, (2006).

As ciclinas da classe D (D1, D2 e D3) ligam-se às CDKs 4 e 6 e fosforilam diversos substratos, incluindo a proteína pRB (MATSUSHIME *et al.*, 1994). A fosforilação de pRB resulta na liberação de fatores de transcrição, predominantemente os pertencentes à família E2F, que ativam vários genes responsáveis pela progressão para a fase S (DYSON, 1998).

O efeito do estrogênio na expressão proteica de ciclina D1 parece ser predominantemente mediado transcricionalmente, uma vez que, o aumento da expressão de mRNA da ciclina D1 antecede o nível de expressão proteica da referida proteína. Inibidores de síntese proteica bloqueiam o aumento de mRNA da ciclina D1, indicando que *CCND1* é diretamente regulado por RE (ALTUCCI *et al.*, 1996; PRALL *et al.*, 1997).

Musgrove *et al.* (1994) demonstraram que a indução de ciclina D1 em linhagens celulares encurta a fase G1 e resulta em um aumento de células que progridem para a fase S. Esta observação é baseada em outros estudos, que demonstraram que a entrada na fase S é impedida através da inibição da expressão de ciclina D1 (QUELLE *et al.*, 1993; BALDIN *et al.*, 1993).

Ravikumar e Ananthamurthy (2014) analisaram 39 amostras de carcinomas de mama através de imuno-histoquímica para ciclina D1 e consideraram positivos os tumores que apresentaram mais de 10% de células expressando uma intensidade de coloração de média a forte. No estudo, 92% dos tumores que eram positivos para RE e RP, incluindo um triplo-positivo (RE, RP e HER2 positivos) também apresentaram positividade para ciclina D1. Nos 10 TN analisados nenhum apresentou positividade para a ciclina D1.

2.6.3 *FOSL1*

O gene *FOSL1* está localizado no cromossomo 11q13 e pertence à família FOS, composta pelos membros: *FOS*, *FOS-B*, *FOSL-1* e *FOSL-2*, bem como as variantes *FOSB2* e *deltaFOSB*. O gene possui aproximadamente 8.31 kb e apresenta 4 éxons e 3 íntrons (FIGURAS 11 e 12).

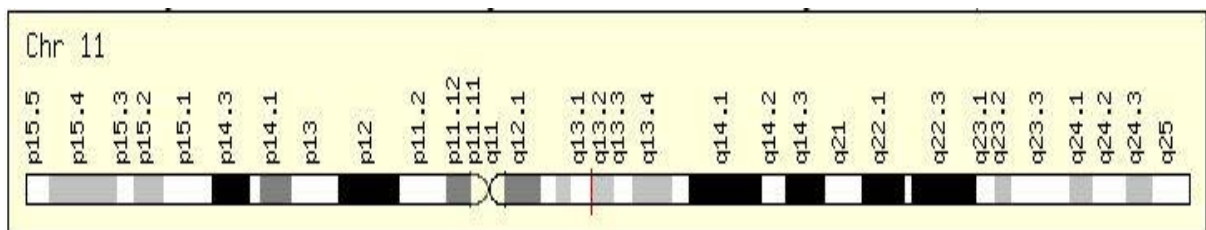


FIGURA 11 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO 11.

LEGENDA: Em vermelho a localização do gene *FOSL1*.

FONTE: <http://www.genecards.org/>

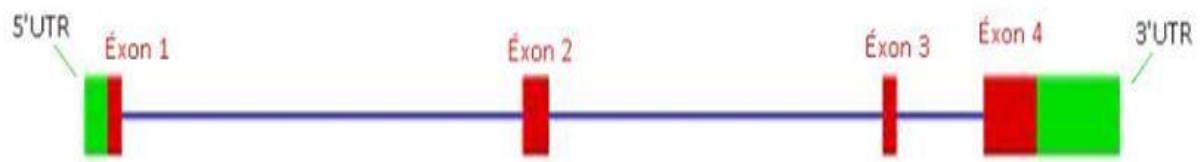


FIGURA 12 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO GENE *FOSL1*.

FONTE: Adaptado de, <http://refgene.com/>

As proteínas codificadas por estes genes necessitam formar heterodímeros com membros da família JUN (*c-JUN*, *JUN-B*, *JUN-D*) para formar complexos de transcrição ativos (KHARMAN-BIZ *et al.*, 2013). Diferentemente das proteínas da família JUN, os membros da família FOS não são capazes de formar homodímeros, apenas heterodímeros, dando origem a diversos complexos de transativação ou transrepressão (MILDE-LANGOSCH, 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que o heterodímero JUN/FOS é mais estável e possui uma ligação mais forte ao DNA que o homodímero JUN/JUN (HALAZONETIS *et al.*, 1988; RYSECK *et al.*, 1991).

Um dos fatores de transcrição formado por estes genes é o AP-1 (formado pelo heterodímero FOSL1/JUN), cuja atividade é induzida por estímulos fisiológicos, como fatores de crescimento, citocinas e estresse ambiental. AP-1 regula diversos processos, como a diferenciação celular proliferação, metástase, angiogênese, apoptose e genes associados com a hipóxia (WISDOM e VERMA, 1993; SHAULIAN e KARIN, 2002; MILDE-LANGOSCH, 2005). Apesar das proteínas da família JUN serem as principais parceiras para formar heterodímeros com as proteínas da família FOS, este fator de transcrição pode formar heterodímeros com outras proteínas em zíper de leucina, como é o caso de ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) e USF1 (*Upstream Stimulating Factor 1*) e USF2 (*Upstream Stimulating Factor 2*)

A regulação da expressão gênica ocorre através da ligação desses fatores de transcrição a determinadas sequências consenso do DNA, como é o caso das regiões *TPA Response Elements* (TRE) e *Serum Response Elements* (SRE) que são essenciais para a ativação transcricional do gene *FOSL1* através de estímulos externos, como mitógenos e citocinas (FIGURA 13) (ADISESHAIAH *et al.*, 2003; ADISESHAIAH *et al.*, 2005).

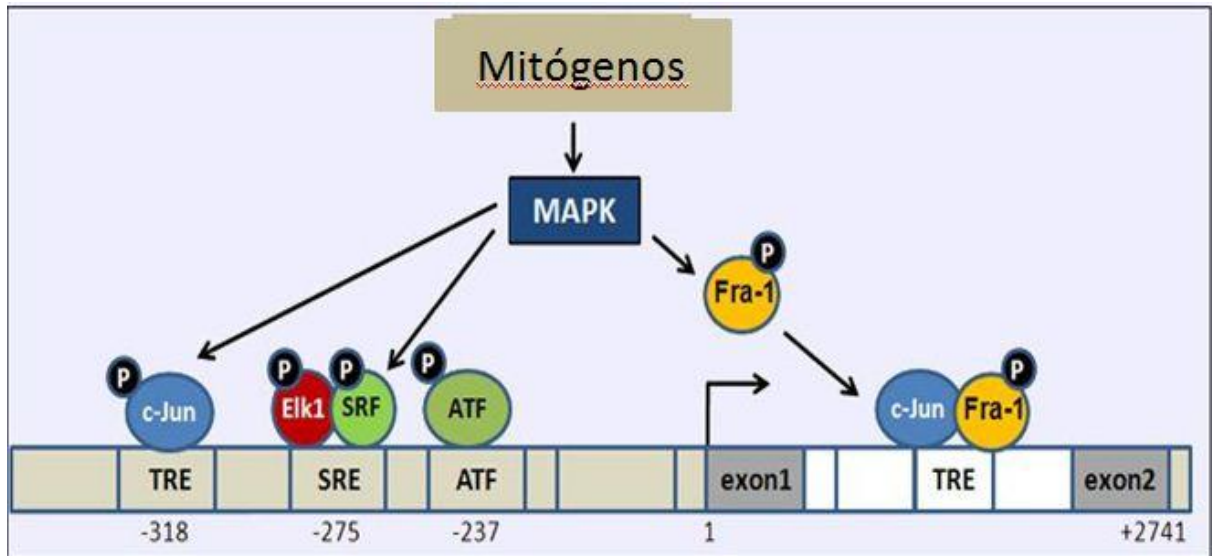


FIGURA 13 - REGULAÇÃO TRANSCRITORIAL DE FOSL1 (FRA1). MAPK ATIVA FATORES DE TRANSCRIÇÃO QUE SE LIGAM AO PROMOTOR DO *FOSL1*. A LIGAÇÃO DE FOSL1 FOSFORILADA E C-JUN AOS SÍTIOS TER DO PRIMEIRO ÍNTRON, REGULA A TRANSCRIÇÃO DE *FOSL1*.

LEGENDA: TRE (*TPA Responde Elements*), SRE (*Serum Response Elements*), SRF (*Serum Response Factors*), ATF (*Activating Transcription Factor Binding Site*).

FONTE: Adaptado de RAJAMOHAN e REDDY, 2013.

Todas as proteínas AP-1 são caracterizadas por uma região em zíper de leucina para a dimerização e ligação ao DNA. Enquanto as proteínas c-FOS e FOSB ancoram um domínio C-terminal de transativação, FOSL1, FOSL2 e FOSB2 não apresentam essa região (FIGURA 14) (TULCHINSKY, 2000.; YOUNG e COLBURN, 2006)

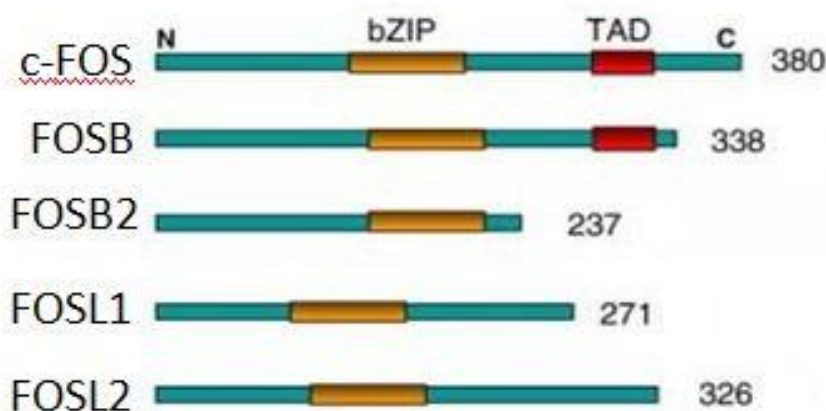


FIGURA 14 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS FOS.

LEGENDA: bZIP (região em zíper de leucina para dimerização e ligação ao DNA), TAD (domínio de transativação C-terminal).

FONTE: Adaptado de TULCHINSKY, 2000.

A atividade de todas as proteínas que compõe a família FOS é mediada por modificações pós-traducionais, sofrendo fosforilação por diferentes quinases, como *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK), *Cyclin-dependent kinase 1* (cdc2), *Protein Kinase A* (PKA) e *Protein Kinase C* (PKC), resultando em uma maior estabilidade e no potencial de transativação dos fatores de transcrição (GRUDA *et al.*, 1994; ROSENBERGER *et al.*, 1999; HURD *et al.*, 2002). Muitas vias de sinalização convergem para o complexo de fator de transcrição AP-1. A influência específica do AP-1 em um promotor depende de diversos fatores, como as proteínas que irão formar o dímero, a arquitetura do promotor, assim como de outros fatores de transcrição e co-ativadores atuando nos promotores (van DAM, 2001).

Philips *et al.* (1998) analisaram a concentração de mRNA de *FOSL1* entre grupos de linhagens celulares de tumores de mama que apresentavam RE positivo e negativo e observaram que a concentração era maior nas linhagens negativas para RE, quando comparadas com as positivas. Belguise *et al.* (2005) confirmaram esse resultado através de análises por *Western Blotting*.

Estudos da alteração de número de cópias do gene *FOSL1* em carcinoma mamário e sua correlação com os diferentes subtipos ainda não foram realizados.

3 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo o mundo e estimativas para os próximos anos indicam um aumento no número de novos casos da doença. Por se tratar de uma doença complexa, não há ainda um completo entendimento da mesma e o desenvolvimento de modelos se tornam mais difíceis.

Os subtipos de carcinomas de mama (Luminal A, Luminal B, HER2⁺ e Basal) apresentam diferentes características, baseadas nos padrões de expressão gênica e no *status* dos receptores hormonais (RE e RP) e do receptor HER2. Os prognósticos das pacientes acometidas pelos diferentes subtipos também é variado, assim como o tratamento a ser utilizado.

Projetos anteriores do nosso grupo utilizando plataformas genômicas (CGH e array-CGH) mostraram regiões cromossômicas preferencialmente alteradas, entre elas 11q13. A partir de análises de bioinformática, selecionamos genes candidatos e, neste projeto, analisamos o número de cópias dos genes *GSTP1*, *CCND1* e *FOSL1* nos subtipos descritos acima. A variação entre os diferentes subtipos poderá contribuir na compreensão da importância de cada destes genes no processo carcinogênico e no potencial dos mesmos na diferenciação dos subtipos de carcinomas mamários.

4 OBJETIVOS

- Avaliar a importância do número de cópias dos genes *GSTP1*, *CCND1* e *FOSL1* na diferenciação de subtipos de carcinomas primários de mama.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o número de cópias dos genes *GSTP1*, *CCND1* e *FOSL1* em carcinomas primários de mama dos subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2⁺ e TN.
- Avaliar se há correlação do número de cópias dos genes em questão com fatores clínicos e histopatológicos.
- Avaliar se os três genes em estudo são alterados em conjunto ou de forma independente nos subtipos de carcinomas primários de mama.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram utilizadas neste trabalho 77 amostras de carcinomas primários de mama, sendo 75 (97,4%) classificadas como CDI. As amostras foram caracterizadas de acordo com a idade das pacientes e características histopatológicas e imuno-histoquímicas (QUADRO 4). As amostras foram obtidas no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) durante o procedimento cirúrgico e processadas no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HNSG. Cada paciente recebeu informações sobre os objetivos da pesquisa e assinou o Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido. Informações relativas aos parâmetros clínicos e histopatológicos não puderam ser obtidas de todas as pacientes, resultando em um número variável dessas informações (TABELA 1).

As amostras utilizadas nesse trabalho foram divididas de acordo com o *status* dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e do HER2, obtidos por análise imuno-histoquímica, dividindo-as em 4 grupos:

- Positivas para os receptores hormonais e negativas para HER2 – **Luminal A**;
- Positivas para os 3 receptores – **Luminal B**;
- Negativas para os receptores hormonais e positivas para HER2 - **HER2⁺**;
- Negativas para os 3 receptores – **TN**.

Paciente	Idade	Diagnóstico	L	G	ER	PR	HER2
1	59	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	NEG	NEG	NEG
2	42	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	NEG	NEG	NEG
3	45	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (>5%)	P	II	NEG	NEG	NEG
4	51	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	A	II	NEG	NEG	NEG
5	43	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	NEG
6	59	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	NEG	NEG	NEG
7	66	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	NEG	NEG	NEG
8	62	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	NEG	NEG	NEG
9	66	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	NEG	NEG	NEG
10	-	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	NEG	NEG	NEG
11	35	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	NEG	NEG	NEG
12	41	Carcinoma Ductal Invasor	P	(III)	NEG	NEG	NEG
13	45	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	POS	POS	NEG
14	54	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
15	33	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	-	POS	POS	NEG
16	65	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	POS	POS	NEG
17	38	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
18	89	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
19	-	Carcinoma Ductal Invasor	P	-	POS	POS	NEG
20	76	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	POS	POS	NEG
21	62	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	III	POS	POS	NEG
22	97	Carcinoma Ductal Invasor			POS	POS	NEG
23	33	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG
24	67	Carcinoma Ductal Invasor associado a carcinoma intraductal comedocarcinoma	P	III	POS	POS	NEG
25	44	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
26	62	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
27	72	Carcinoma Ductal Invasor associado a carcinoma intraductal comedocarcinoma	A	II	POS	POS	NEG
28	86	Carcinoma Ductal Invasor associado a CDIS padrao sólido	A	III	POS	POS	NEG

29	73	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
30	46	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Ductal in situ sólido cibriforme	P	III	POS	POS	NEG
31	81	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG
32	58	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
33	42	Carcinoma Ductal Invasor; associado a carcinoma in situ cribriforme	A	II	POS	POS	NEG
34	80	Carcinoma Ductal Invasor, com Ca in situ associado, comedo e papilífero	A	II	POS	POS	NEG
35	-	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG
36	78	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	NEG
37	-	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	POS	POS	NEG
38	48	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG
39	59	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG
40	68	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	POS	POS	NEG
41	-	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	POS	POS	NEG
42	79	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (>5%)	A	I	POS	POS	POS
43	53	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	P	III	POS	POS	POS
44	51	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS
45	71	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	POS
46	40	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	II	POS	POS	POS
47	72	Carcinoma Ductal Invasor Multicêntrico, associado a Carcinoma Intraductal	A	I	POS	POS	POS
48	63	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS
49	56	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	P	II	POS	POS	POS
50	51	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS
51	47	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	POS	POS	POS
52	54	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	P	II	POS	POS	POS
53	47	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS
54	60	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS
55	44	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma intraductal	A	II	POS	POS	POS
56	82	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS

57	60	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	I	POS	POS	POS
58	61	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (10%)	P	II	POS	POS	POS
59	44	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS
60	70	Carcinoma Ductal Invasor multifocal	P	-	POS	POS	POS
61	42	Carcinoma Intraductal subtipo Comedocarcinoma	P	III	POS	POS	POS
62	72	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	POS
63	66	Carcinoma Ductal Invasor com Recidiva	P	I	POS	POS	POS
64	57	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS
65	62	Carcinoma Invasor Mucinoso, associado a carcinoma ductal invasor	A	I	POS	POS	POS
66	45	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	POS
67	42	Carcinoma Ductal Invasor	-	II	POS	POS	POS
68	63	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (20%)	P	III	NEG	NEG	POS
69	53	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	NEG	NEG	POS
70	72	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	POS
71	43	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	NEG	NEG	POS
72	44	Carcinoma Ductal	P		NEG	NEG	POS
73	55	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	POS
74	79	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	A	III	NEG	NEG	POS
75	58	Carcinoma Ductal Invasor associado a CDIS e comedocarcinoma	P	II	NEG	NEG	POS
76	89	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	POS
77	84	Carcinoma Ductal Invasor; comedocarcinoma	P	III	NEG	NEG	POS

QUADRO 4- CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO

LEGENDA: Idade, idade da paciente em anos no momento do diagnóstico; L, presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares; P, presença; A, ausência; G, grau do tumor; RE, status do receptor de estrogênio; RP, status do receptor de progesterona; HER2, amplificação do oncogene HER2.

FONTE: O autor (2014)

Tabela 1 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES PORTADORAS DE CARCINOMA MAMÁRIO EM CADA SUBGRUPO

	N	Idade Média	Grau (%)	Metástase em linfonodos
ER⁺, PR⁺, HER2⁻ (Luminal A)	26	57,3 ± 12,0	Grau I (20%) Grau II (52%) Grau III (28%)	P (52%) A (48%)
ER⁺, PR⁺, HER2⁺ (Luminal B)	29	61,3 ± 18,3	Grau I (12%) Grau II (60%) Grau III (28%)	P (51,9%) A (48,1%)
ER⁻, PR⁻, HER2⁺ (HER2⁺)	10	64 ± 16,3	Grau I (0%) Grau II (33,3%) Grau III (66,7%)	P (70%) A (30%)
ER⁻, PR⁻, HER2⁻ (Tripla-Negativo)	12	51,7 ± 11,0	Grau I (0%) Grau II (50%) Grau III (50%)	P (50%) A (50%)

LEGENDA: (RE) receptor de estrogênio, (RP) receptor de progesterona, (HER2) *Human Epidermal growth factor Receptor 2*, (N) número amostral, (P, A) presença, ausência de metástase em linfonodos.

FONTE: O autor (2014)

5.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

As amostras foram processadas para a remoção de tecido adiposo, tecido estromal e vasos sanguíneos, utilizando tesouras e pinças esterilizadas e placas de Petri descartáveis. O material foi estocado em tubos do tipo *Eppendorf* e mantido a - 80 °C até o momento da extração de DNA.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração de DNA foram utilizados fragmentos de amostras de tumor que foram homogeneizados em agitador com 130 µL de tampão de proteinase K, e 70 µL de proteinase K 10 µg/mL e incubado em banho-maria a 55 °C por 24 horas. Em seguida foi realizada a incubação das amostras em banho seco a 95 °C por 10 minutos para a inativação da proteinase K. Posteriormente foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool iso-amílico 25:24:1 v/v, seguido de homogeneização em

agitador por 15 segundos e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos (este passo foi repetido mais uma vez). Foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto e 0,2 volumes de acetato de amônio 7,5 M, e mantido no freezer -20 °C por 24 horas. Em seguida foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos e descartado o sobrenadante, seguido da adição de 1 mL de etanol 70% e centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspensionado em 40 µL de água ultra pura.

5.4 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

A técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada para a determinação do número de cópias dos genes *CCND1*, *FOSL1* e *GSTP1*, nas 77 amostras de DNA extraídas dos tumores (TABELA 1).

Para a avaliação do número de cópias dos três genes descritos acima foi utilizado o ensaio *TaqMan® Copy Number Assays* da empresa *Life Technologies™*. Essa metodologia é baseada em uma reação dupla de PCR em tempo real que detecta a sequência do gene alvo do estudo e a sequência de um gene de referência (*RNASE P*) conhecido por apresentar duas cópias em um genoma diplóide. Este método de detecção relativa é usado para determinar o número de cópias do gene de interesse em amostras de DNA alvo.

Nas placas, contendo as amostras tumorais, foi incluído DNA controle com o número de cópias dos genes de interesse conhecido, composto por um *pool* de amostras de indivíduos não acometidos pela doença. Para cada reação foram utilizados: 5 µL de *Master Mix*, 2 µL de DNA (na concentração de 5 ng/µL), 0,5 µL de mix do gene de estudo (contendo o par de *primers* e a sonda *TaqMan®*), 0,5 µL de mix do gene *RNASE P* (*primers* e sonda *TaqMan®*) e 2 µL de água ultra pura, totalizando 10 µL de volume de reação. Todas as amostras alvo e o DNA controle foram analisadas em triplicatas nas placas de reação. Os reagentes utilizados nestas reações e as especificações do ciclo de PCR encontram-se descritos na (TABELA 2). O equipamento utilizado foi o *ViiA 7 (Applied Biosystems™)*.

As análises foram realizadas utilizando-se o *software Copy Caller (Life Technologies™)*. Não foram consideradas amostras que apresentaram valor de CT > 33 ciclos e valor de z-score ≥ 2.65 . O número de cópias do DNA teste foi calculado

em comparação com o número de cópias no DNA controle pelo *software*, que considera ganho quando o número de cópias calculado está em 2,51 ou acima, perda quando está em 1,49 ou abaixo e normal quando está entre 1,50 e 2,50.

Este método é adotado devido à padronização prévia dos ensaios comercializados pela empresa, fornecendo eficiência de reação de 100%, possibilitando que os genes alvos e de referência sejam testados e comparados com precisão.

Tabela 2 - COMPONENTES DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES EM ESTUDO.

Componente	Volume por reação (µl)
2x TaqMan Genotyping Master Mix	5,0
TaqMan Copy Number Assay (20x)	0,5
TaqMan Copy Number Reference Assay (20x)	0,5
Água ultra pura	2,0
DNA (5ng/ µl)	2,0
Volume total	10

FONTE: O autor (2014)

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o testes não paramétrico de *Kruskall-Wallis* e utilizando o método de *Dunn* para a comparação entre os grupos. A dependência das alterações do número de cópias em função dos diferentes subtipos de tumor foram analisadas pelo coeficiente de regressão. O teste de qui-quadrado foi utilizado para avaliar se as alterações do número de cópias (ganho ou não ganho) se distribuíam igualmente entre os três genes analisados.

Consideramos como estatisticamente significativo os valores de $p < 0,05$.

Para a realização do teste de *Kruskall-Wallis* foi utilizado o *software GraphPad Prism Version 6.01* para *Windows* (Disponível em: www.graphpad.com).

6 RESULTADOS

6.1 Número de cópias de acordo com os subtipos de carcinomas mamários

A análise da alteração do número de cópias dos genes *GSTP1*, *CCND1* e *FOSL1* nas 77 amostras de carcinomas primários de mama revelou que o gene *FOSL1* é o que apresenta a maior alteração do número de cópias, apresentando ganho em 70% das amostras analisadas (FIGURA 15), enquanto, os genes *GSTP1* e *CCND1* apresentaram número de cópias normal em 72% e 64% das amostras, respectivamente (FIGURAS 16 e 17).



FIGURA 15 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA.
FONTE: O autor (2014)



FIGURA 16 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA.
FONTE: O autor (2014)

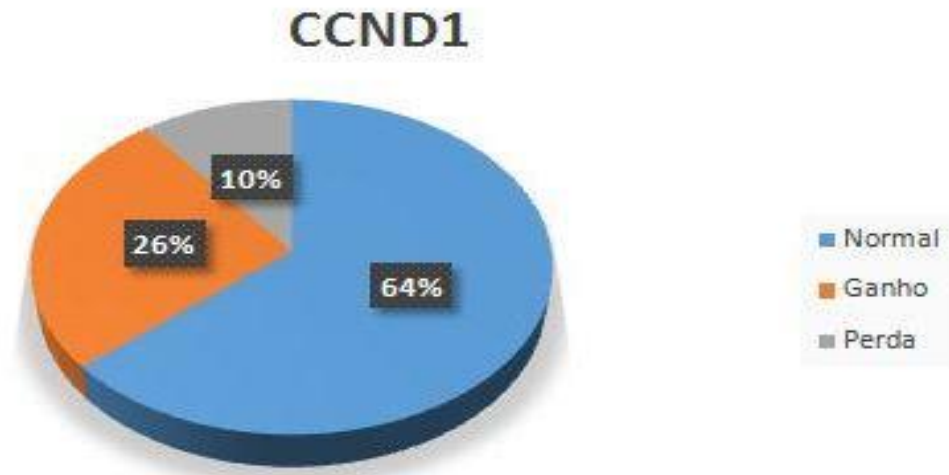


FIGURA 17 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA.
 FONTE: O autor (2014)

Para cada subtipo (Luminal A, Luminal B, HER2⁺ e triplo-negativo) foi realizada a análise da alteração de número de cópias.

O gene *FOSL1* apresentou em média 2,68 cópias para o subtipo Luminal A, 3,16 para o subtipo Luminal B, 4,02 para o subtipo HER2⁺ e 5,08 para os TN.

Estão apresentados nos (FIGURAS 18, 19, 20 e 21) os números de cópias do gene *FOSL1* por amostra e de acordo com o subtipo de carcinoma mamário.

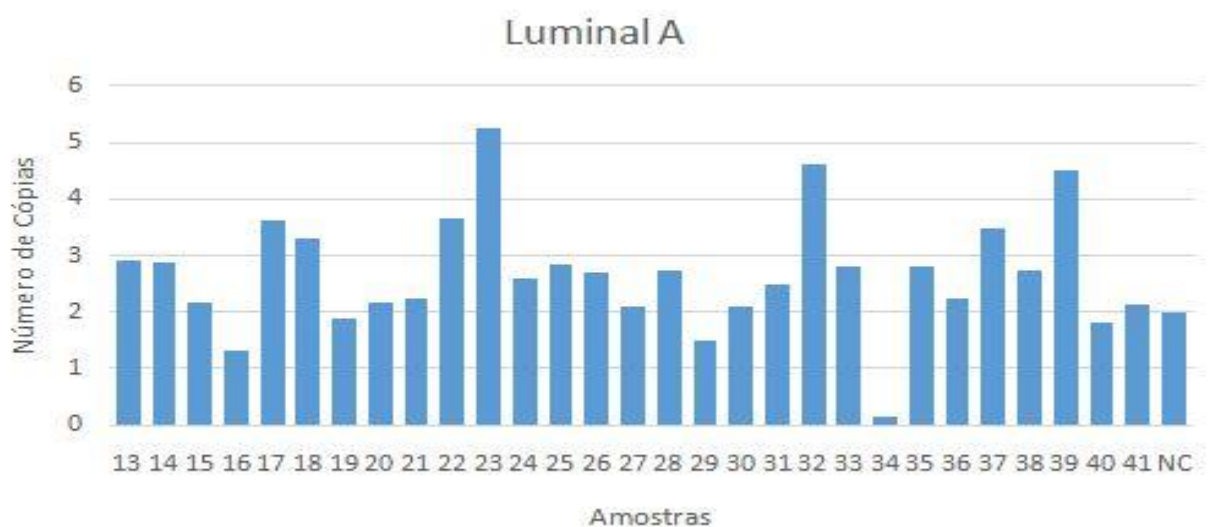


FIGURA 18 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL A.
 FONTE: O autor (2014)

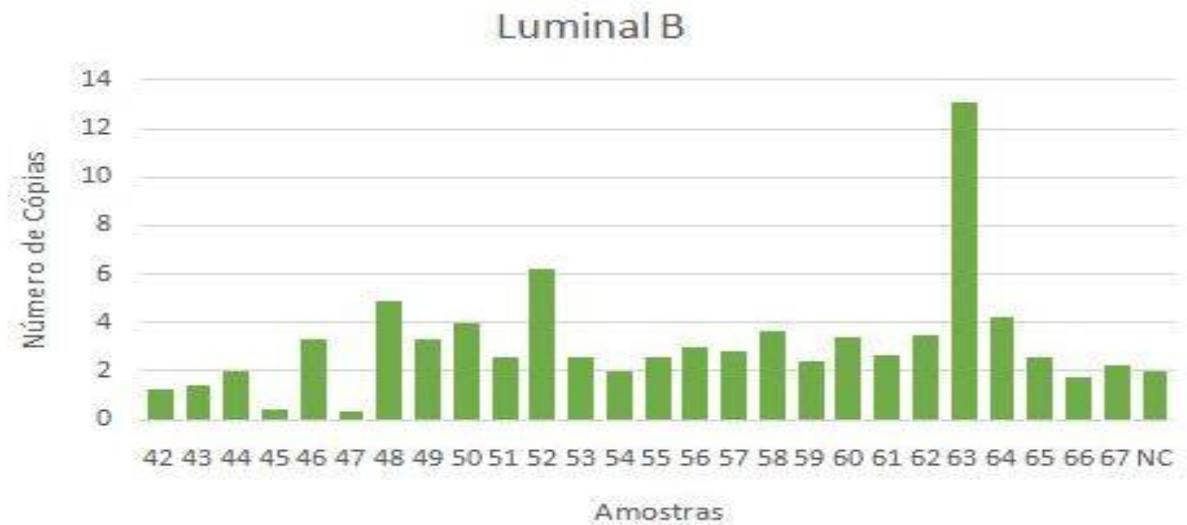


FIGURA 19 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL B.
 FONTE: O autor (2014)



FIGURA 20 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO HER2+.
 FONTE: O autor (2014)



FIGURA 21 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA TN.
 FONTE: O autor (2014)

Para o gene *GSTP1*, foi observado em média 2,32 cópias para o subtipo Luminal A; 2,18 para o subtipo Luminal B; 2,12 para o subtipo HER2⁺ e 2,75 para os tumores triplo-negativos.

Estão apresentados nas FIGURAS 22, 23, 24 e 25 os números de cópias do gene *GSTP1* por amostra e de acordo com o subtipo do carcinoma mamário.

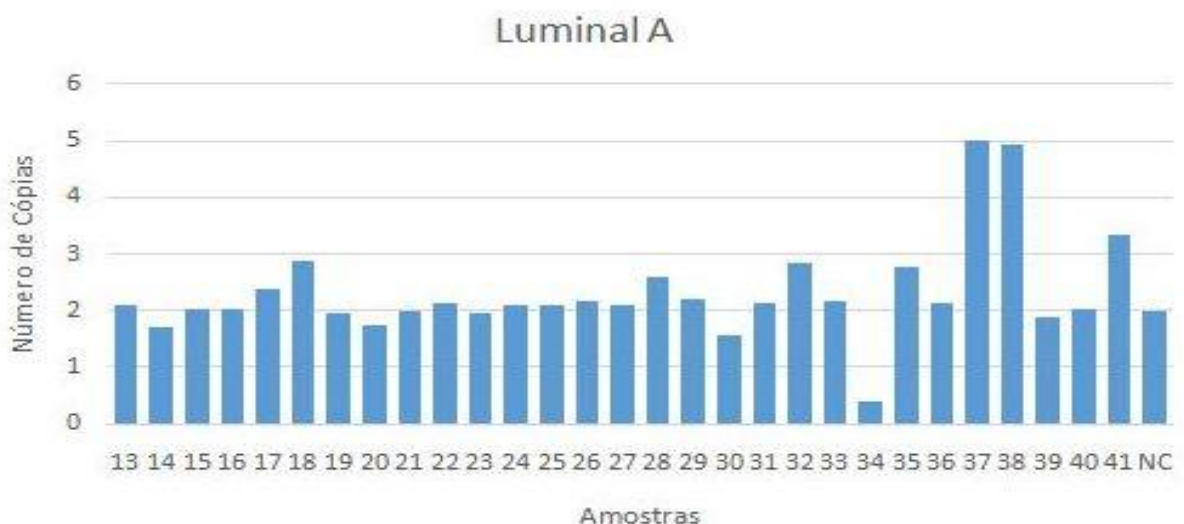


FIGURA 22 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL A.
 FONTE: O autor (2014)



FIGURA 23 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL B.
 FONTE: O autor (2014)

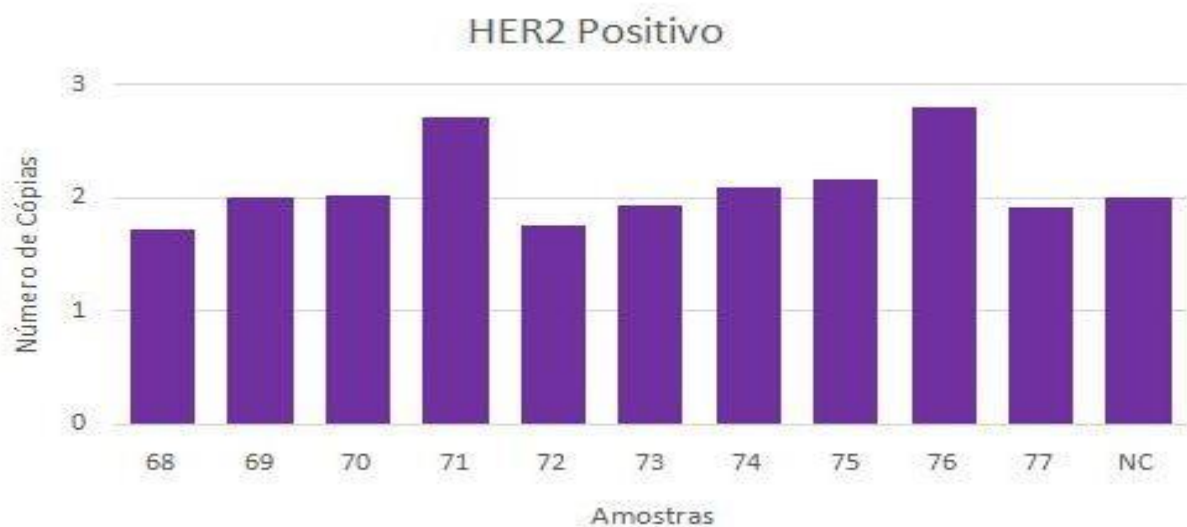


FIGURA 24 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO HER2⁺.
 FONTE: O autor (2014)



FIGURA 25 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS.
 FONTE: O autor (2014)

O gene *CCND1* apresentou em média 2,3 cópias para o subtipo Luminal A, 3,1 para o subtipo Luminal B; 1,9 para o subtipo HER2⁺ e 2,52 para os TN.

Estão apresentados nas FIGURAS 26, 27, 28 e 29 os números de cópias do gene *CCND1* por amostra e de acordo com o subtipo de carcinoma mamário.

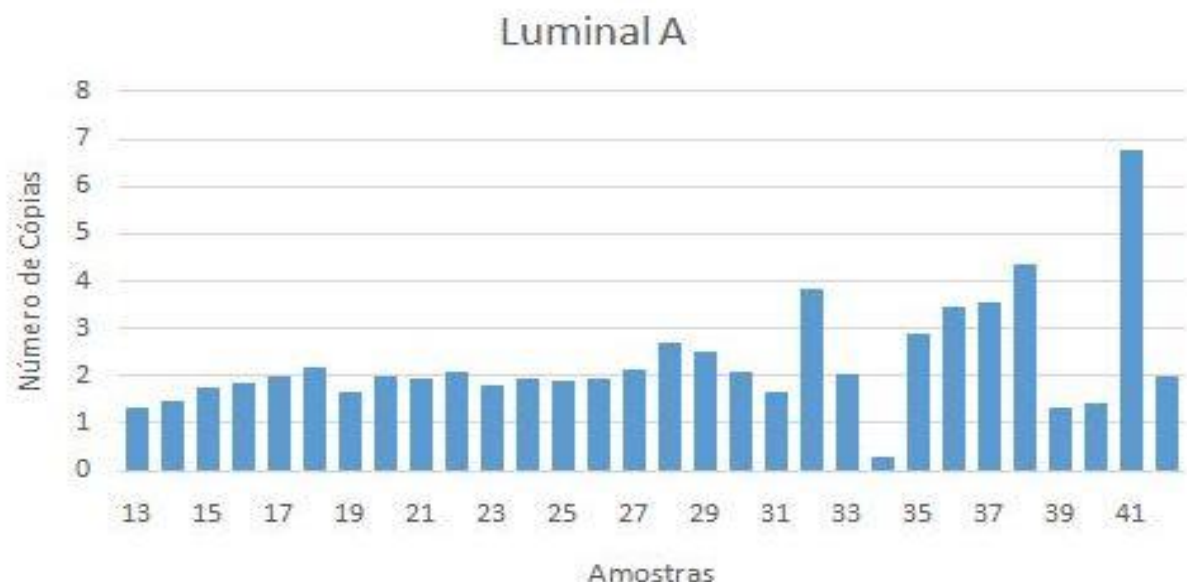


FIGURA 26 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL A.
 FONTE: O autor (2014)

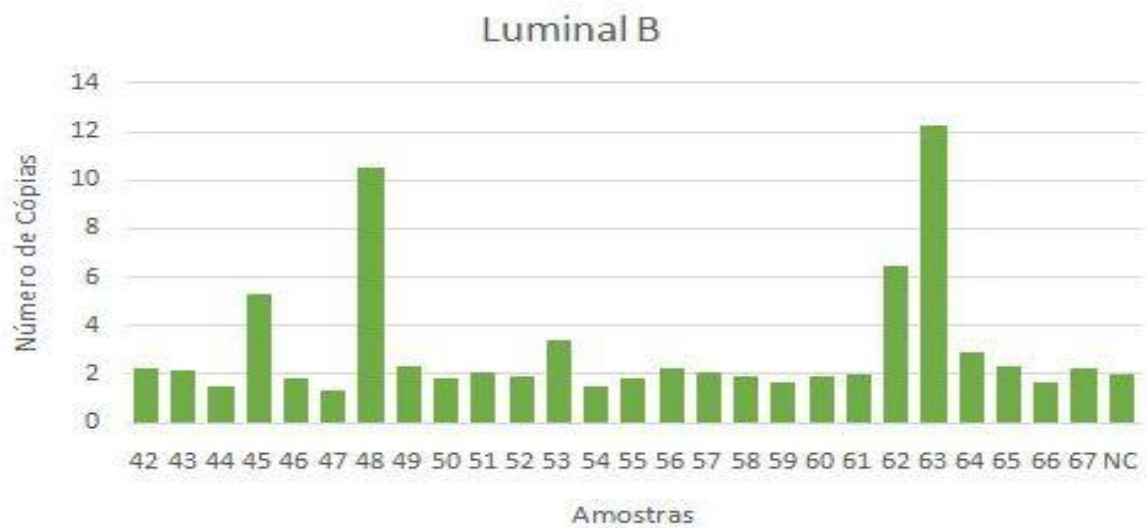


FIGURA 27 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL B.
 FONTE: O autor (2014)



FIGURA 28 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO HER2⁺.
 FONTE: O autor (2014)



FIGURA 29 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* POR AMOSTRA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS.
 FONTE: O autor (2014)

Os dados de números de cópias obtidos foram analisados através do *software GraphPad Prism* para averiguar se tais alterações são estatisticamente significativas. Os dados para o gene *FOSL1* submetidos ao Teste de *Kruskal-Wallis* mostraram que existem diferenças significativas ($p < 0,0001$) do número de cópias de acordo com o subtipo. Com a utilização do método de *Dunn* foi possível identificar entre quais subtipos a alteração do número de cópias foi significativa, sendo entre os tumores TN/Luminal A e TN/Luminal B. Não houve diferenças significativas entre os demais subtipos.

Os dados referentes à alteração do número de cópias do gene *FOSL1* entre os subtipos estão apresentados na FIGURA 30.

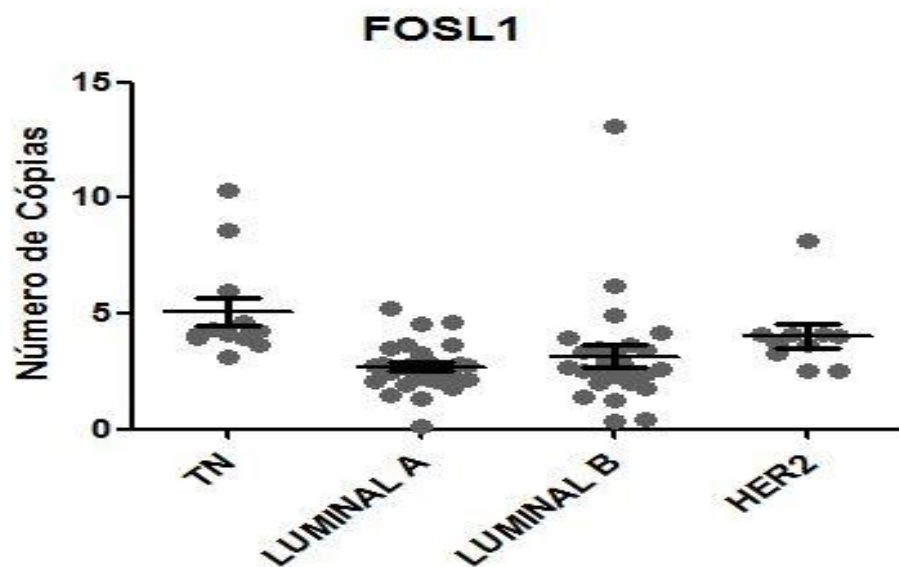


FIGURA 30 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* DE ACORDO COM OS SUBTIPOS.
FONTE – O autor (2014)

Foi realizada uma análise de regressão linear com o intuito de inferir se a alteração do número de cópias do gene *FOSL1* é dependente do subtipo dos carcinomas mamários. A análise indicou que as alterações no número de cópias dependem do subtipo de tumor ($b = 0,79 \pm 0,20$; $t = 3,95$; $p < 0,001$). Os TN são os que apresentam maior alteração do número de cópias (FIGURA 31).

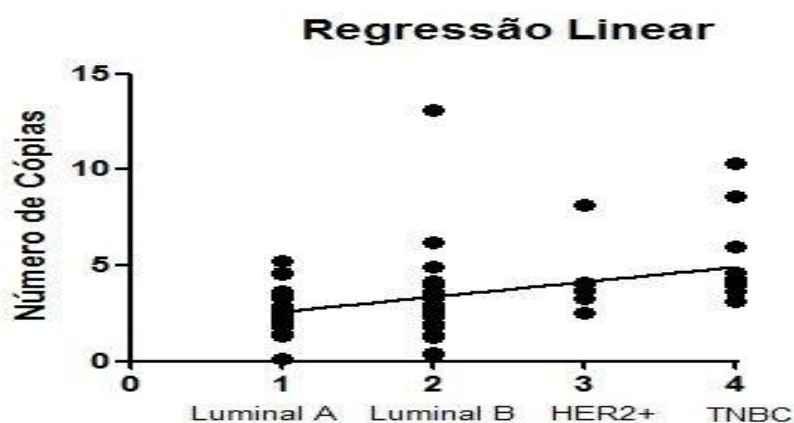


FIGURA 31 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* E RETA DE REGRESSÃO LINEAR DE ACORDO COM OS SUBTIPOS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS.
LEGENDA: TN (*Triple Negative*).
FONTE: O autor (2014)

A análise da alteração do número de cópias do gene *GSTP1* entre os subtipos de carcinomas mamários não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,1130$) (FIGURA 32).

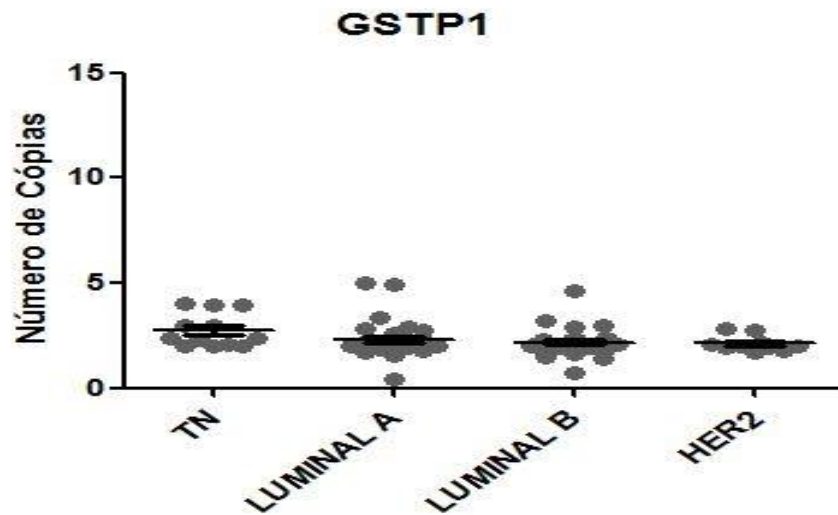


FIGURA 32 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* DE ACORDO COM OS SUBTIPOS.

FONTE – O autor (2014)

Para o gene *CCND1* a análise da alteração do número de cópias não apresentou diferenças significativas entre os subtipos de carcinomas mamários ($p = 0,3092$) (FIGURA 33).

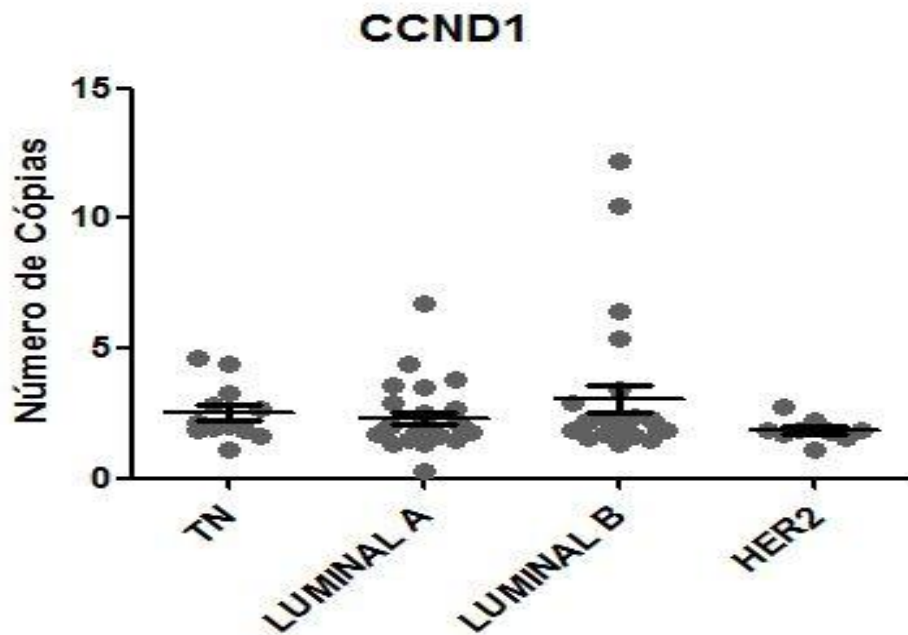


FIGURA 33 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* DE ACORDO COM OS SUBTIPOS.

FONTE – O autor (2014)

Através do teste do qui-quadrado verificamos que as alterações do número de cópias não se distribuíram igualmente para três genes analisados ($\chi^2 = 44,36$; $p < 0,001$). Observou-se que os qui-quadrados parciais obtidos para o gene *FOSL1* foram os principais responsáveis pela diferença no χ^2 total (17,75 para ganho e 11,75 para não ganho = 29,5; representando 67% do valor do χ^2 total).

6.2 PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

6.2.1 PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES

Foram realizadas análises para verificar se a presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares está relacionada com a alteração do número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1* e *CCND1*. Para o gene *FOSL1*, quando analisados os tumores que apresentam metástase em linfonodos axilares, foi verificado que em 77% das amostras houve ganho, enquanto que nos tumores que não apresentam metástase em linfonodos axilares, 65% apresentaram ganho

(FIGURAS 34 e 35). Para o gene *GSTP1*, quando analisada a alteração do número de cópias em amostras com metástase em linfonodos axilares, foi verificado que 20% apresentaram ganhos, enquanto que nas amostras sem metástase em linfonodos axilares, 26% apresentaram ganho (FIGURAS 36 e 37). Para o gene *CCND1*, quando avaliado a alteração do número de cópias, foi verificado que 20% das amostras com metástases nos linfonodos axilares apresentaram ganhos, enquanto que nas amostras sem metástases nos linfonodos axilares houve ganho em 32% (FIGURAS 38 e 39).

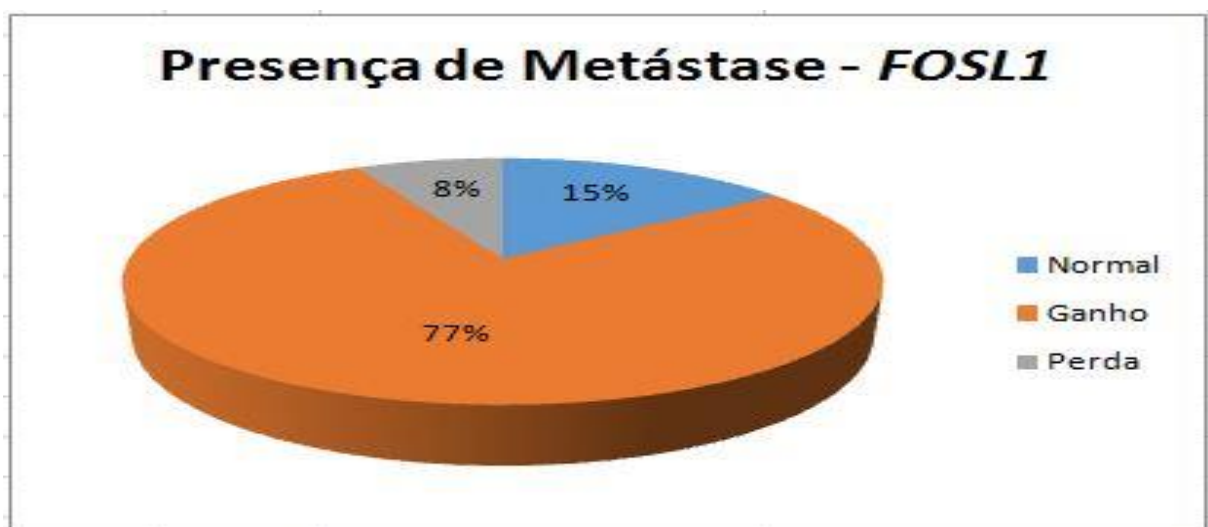


FIGURA 34 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA QUE APRESENTAM METÁSTASES EM LINFONODOS AXILARES.
FONTE: O autor (2014)

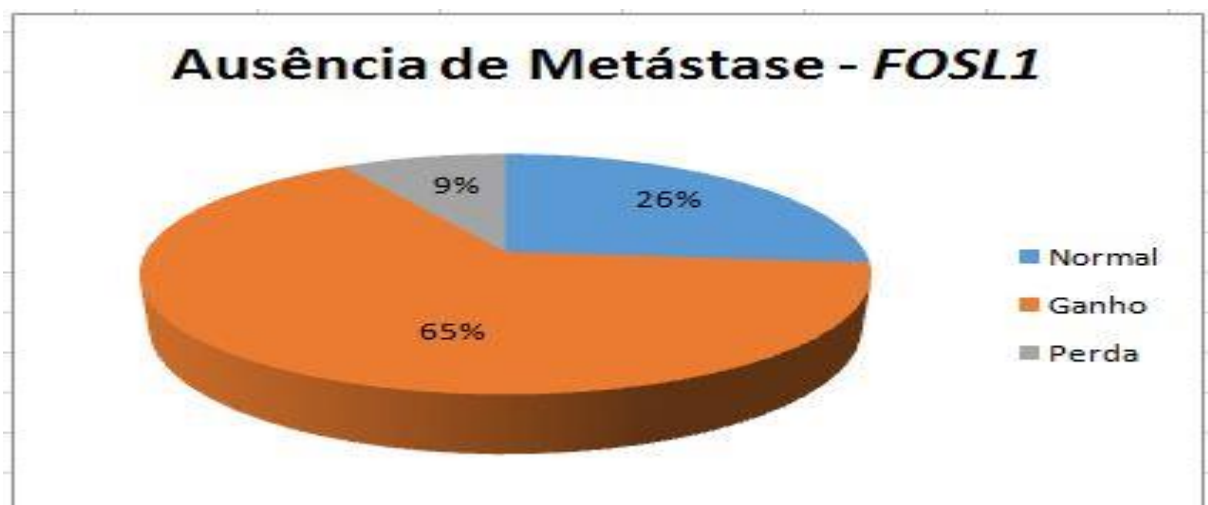


FIGURA 35 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA COM AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.
FONTE: O autor (2014)

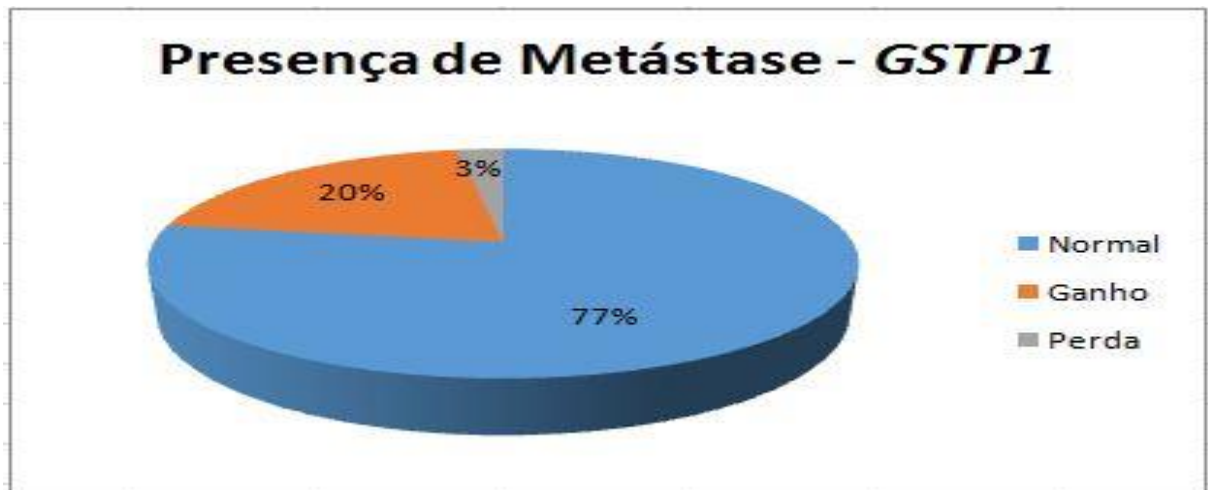


FIGURA 36 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA QUE APRESENTAM METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.
FONTE: O autor (2014)

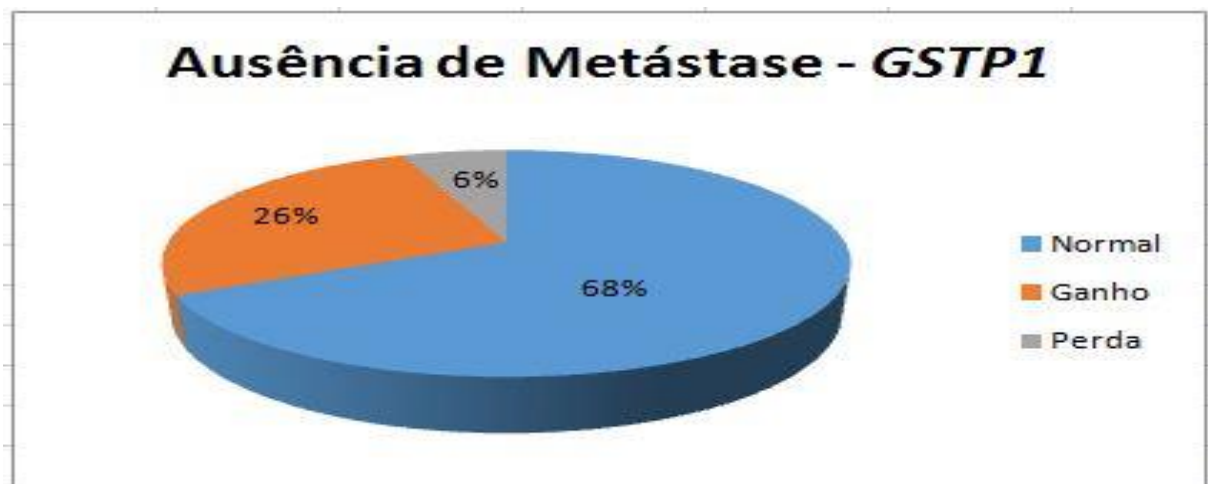


FIGURA 37 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA COM AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.
FONTE: O autor (2014)

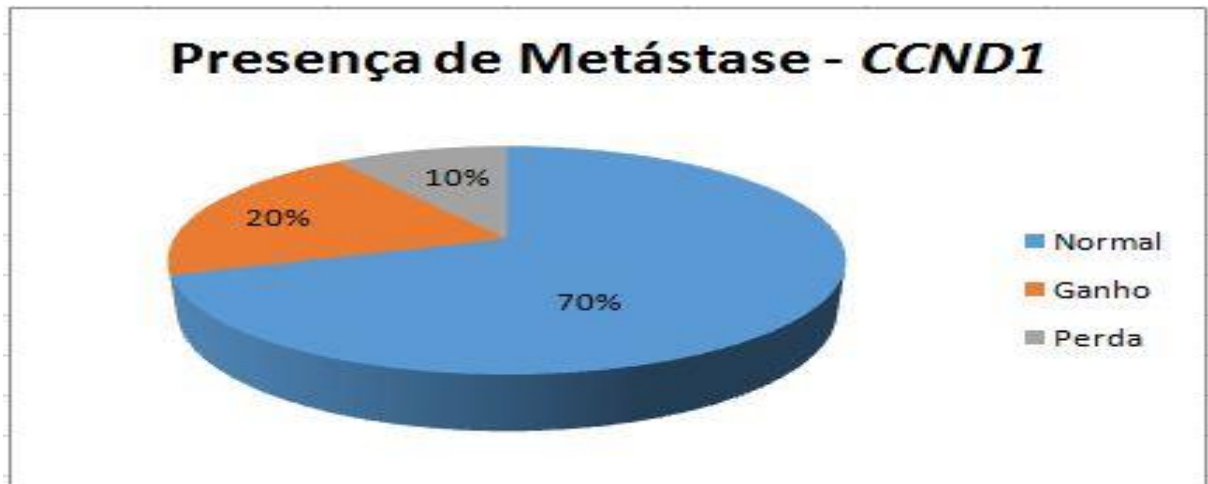


FIGURA 38 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA QUE APRESENTAM METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.
 FONTE: O autor (2014)

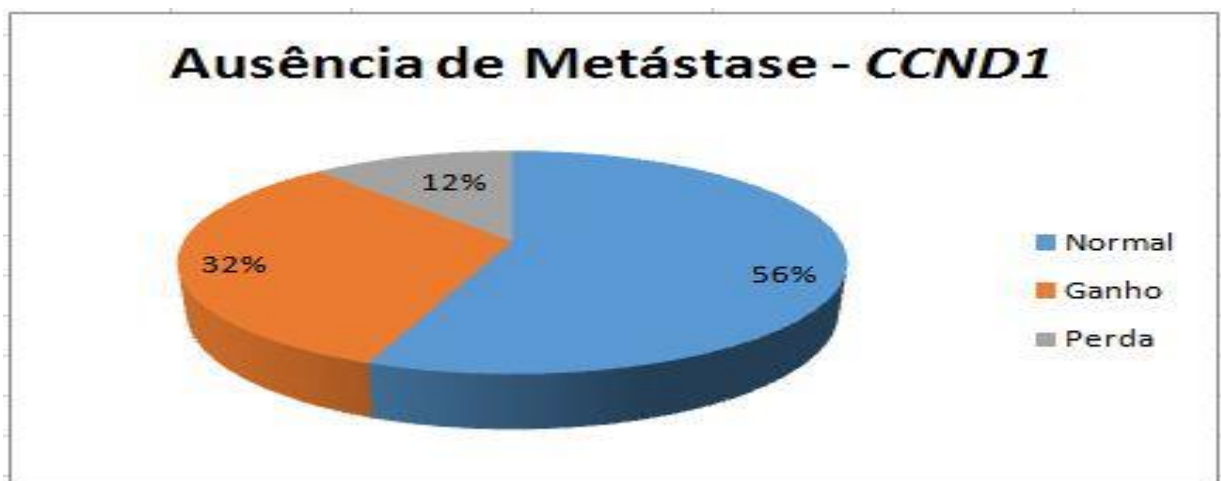


FIGURA 39 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA COM AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.
 FONTE: O autor (2014)

Após a submissão dos dados ao teste *t* de *Student* verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre a alteração do número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1* e *CCND1* em pacientes com carcinomas mamários com presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares ($p = 0,2328$; $p = 0,6908$ e $p = 0,9148$, respectivamente) (FIGURAS 40, 41 e 42, respectivamente).

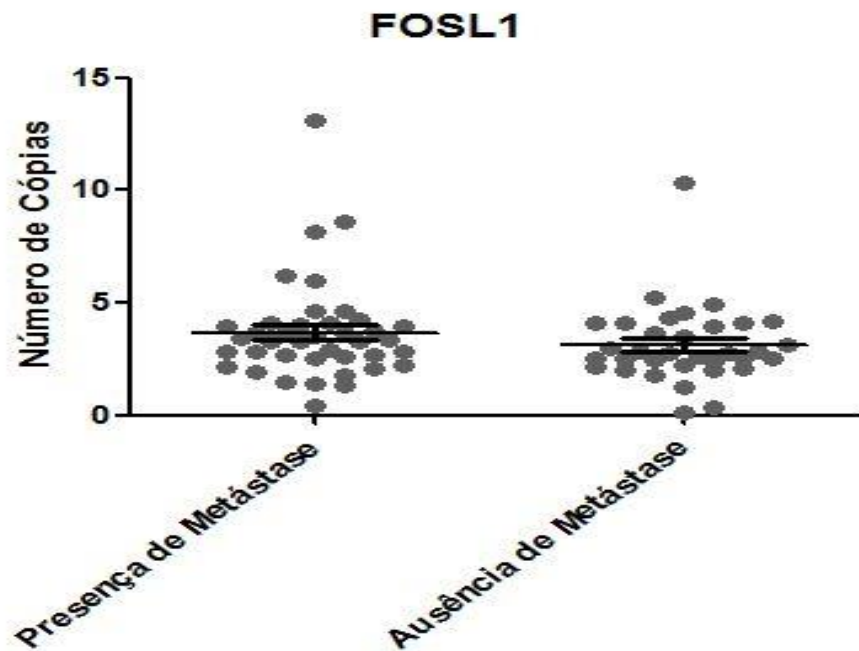


FIGURA 40 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* EM PACIENTES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS.
FONTE: O autor (2014)

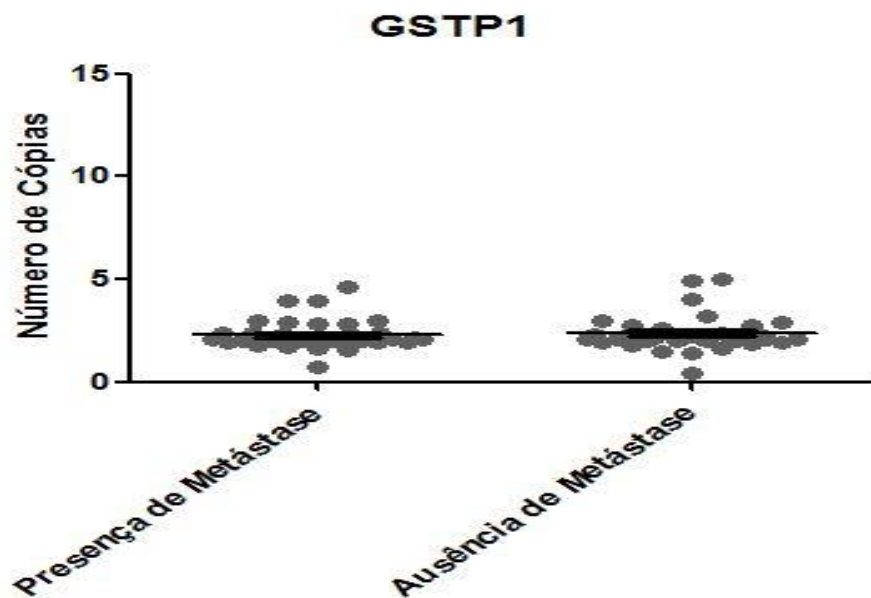


FIGURA 41 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* EM PACIENTES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS.
FONTE: O autor (2014)

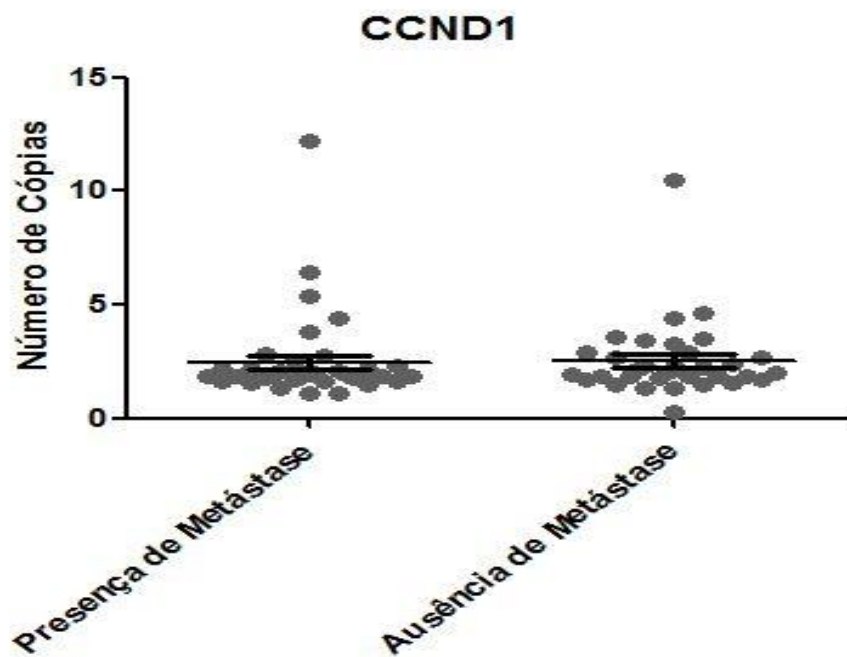


FIGURA 42 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM PACIENTES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS.
FONTE: O autor (2014)

6.2.2 GRAU HISTOLÓGICO

Foi utilizado o grau histológico para avaliar se há relação de tal parâmetro com alterações do número de cópias. Os dados submetidos ao teste *t* de *Student* mostraram que para os genes *FOSL1*, *GSTP1* e *CCND1* não há diferenças significativas ($p = 0,5576$, $p = 0,4213$ e $0,4180$, respectivamente) do número de cópias dos genes em questão, entre pacientes que apresentam tumores com graus I e II em relação aos de grau III (FIGURAS 43, 44 e 45, respectivamente).

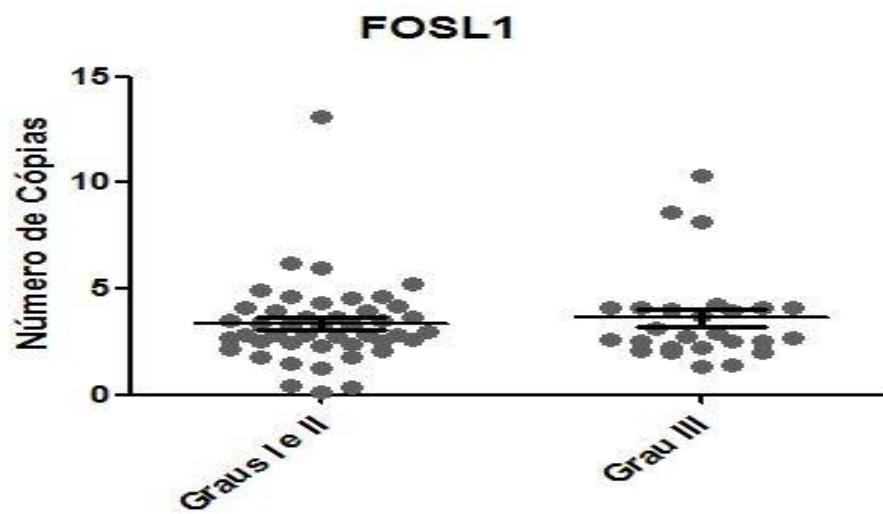


FIGURA 43 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* EM PACIENTES COM TUMORES GRAUS I E II EM RELAÇÃO AOS DE GRAU III.
 FONTE: O autor (2014)

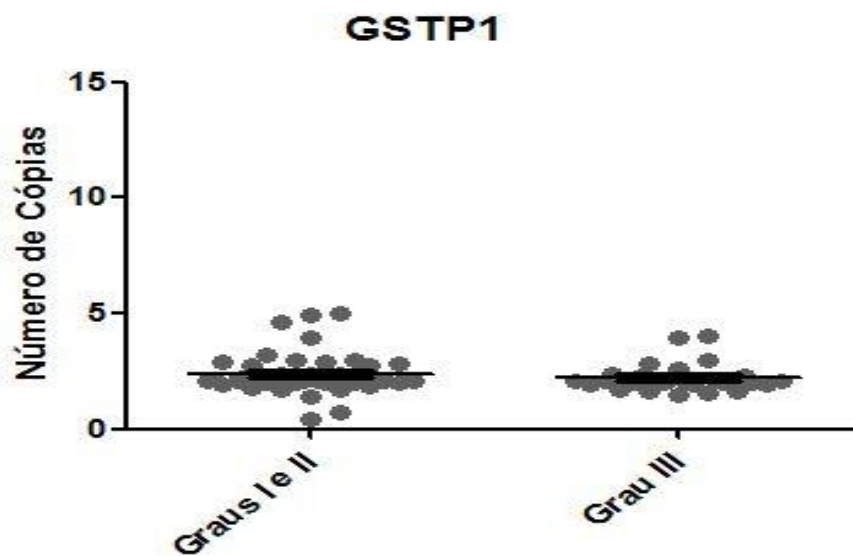


FIGURA 44 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* EM PACIENTES COM TUMORES GRAUS I E II EM RELAÇÃO AOS DE GRAU III.
 FONTE: O autor (2014)

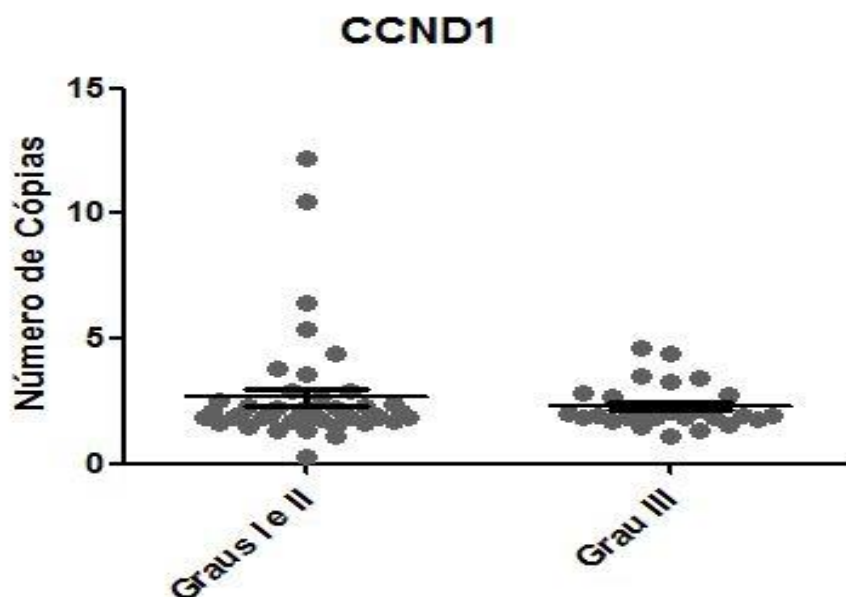


FIGURA 45 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM PACIENTES COM TUMORES GRAUS I E II EM RELAÇÃO AOS DE GRAU III.
 FONTE: O autor (2014)

6.2.3 IDADE

As pacientes com informação de idade disponível foram separadas de acordo com a idade, sendo consideradas arbitrariamente no grupo de pré-menopausa aquelas que apresentavam idade inferior a 50 anos na data da cirurgia e em pós-menopausa aquelas com idade superior a 50 anos. A análise da alteração do número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1* e *CCND1* não se mostrou significativa, após a submissão ao teste *t* de *Student* ($p = 0,8139$, $p = 0,7940$ e $p = 0,3457$, respectivamente) (FIGURAS 46, 47 e 48, respectivamente)

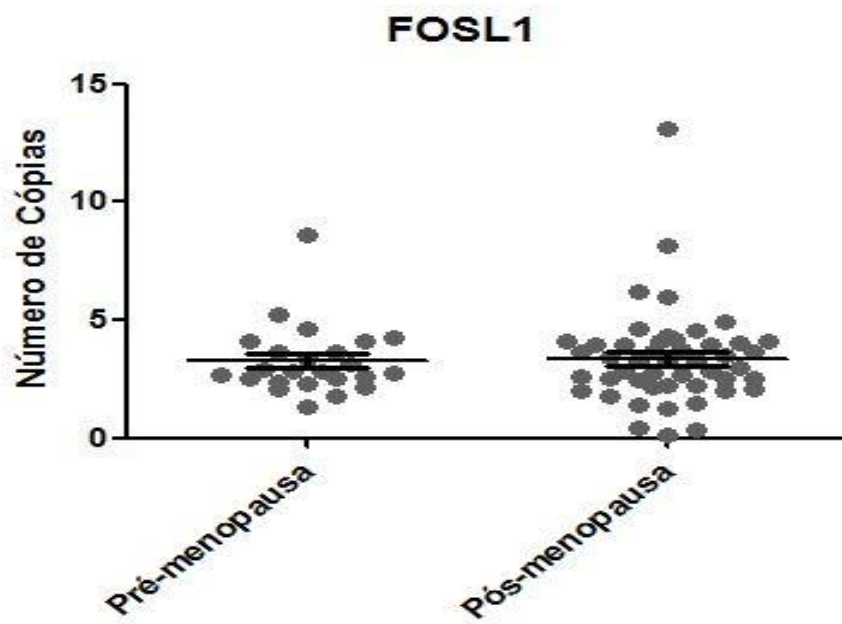


FIGURA 46 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FOSL1* EM PACIENTES EM PRÉ-MENOPAUSA E PÓS-MENOPAUSA.
FONTE: O autor (2014)

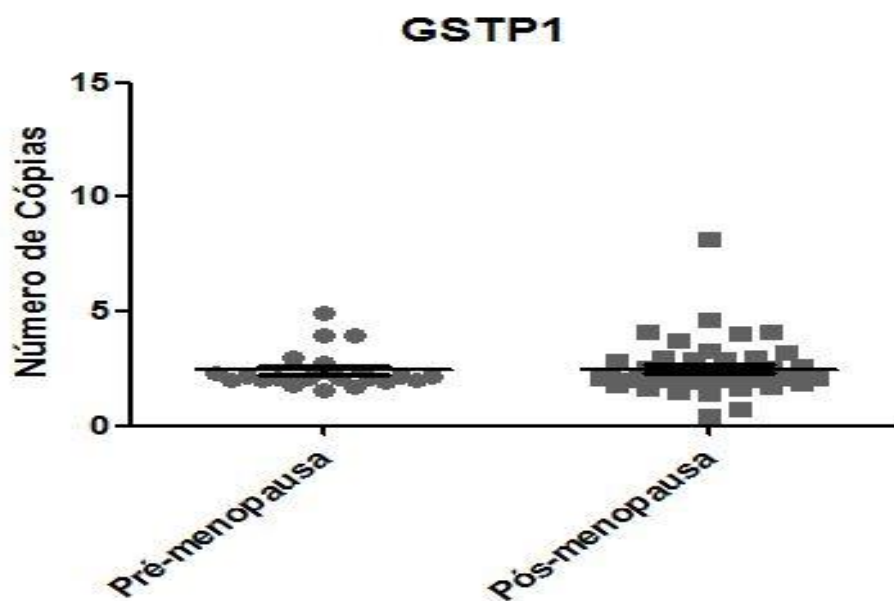


FIGURA 47 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *GSTP1* EM PACIENTES EM PRÉ-MENOPAUSA E PÓS-MENOPAUSA.
FONTE: O autor (2014)

7 DISCUSSÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente que acomete a população feminina no mundo, representando cerca de 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. A prevenção primária, através de hábitos de vida saudáveis pode contribuir para que aproximadamente 30% dos casos de câncer de mama sejam evitados. Quando diagnosticado precocemente apresenta relativamente um bom prognóstico, no entanto, as taxas de mortalidade por essa doença no Brasil são elevadas, provavelmente devido ao diagnóstico tardio. Em países desenvolvidos, a taxa de sobrevida para essa doença em um, cinco, dez e vinte anos é de 95,8%, 85,1%, 77% e 64%, respectivamente (INCA, 2014).

Conforme citado anteriormente, a expressão gênica em larga escala não é uma forma acessível de se obter informações acerca do subtipo tumoral. Desse modo, uma classificação simplificada tem sido adotada de maneira a facilitar a tomada de decisões na prática diária. Para isso, utiliza-se da imuno-histoquímica para a detecção Re e RP, da elevada expressão de HER2, assim como a medição da proteína Ki-67. A classificação a partir do parâmetro histopatológico é similar à expressão gênica, porém, não é idêntica (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011).

Rotineiramente, os subtipos de câncer de mama são classificados através de imuno-histoquímica, corando-se os tecidos tumorais para avaliar a presença ou ausência de RE, RP e o aumento de expressão de HER2. Esta classificação tem valor prognóstico e auxilia no processo de encaminhamento para a melhor opção de tratamento disponível (SANDHU *et al.*, 2010).

Os tumores que apresentam baixas ou nenhuma expressão dos receptores hormonais e do oncogene HER2 são denominados TN, e apresentam um padrão semelhante ao dos tumores do subtipo basal, no entanto, não há uma completa sobreposição dos dois grupos e apenas uma parcela dos tumores TN expressam os marcadores das células basais, como as CK5 e CK14 (RODY *et al.*, 2011). Estudos recentes demonstraram que aproximadamente 70% dos TN enquadram-se no subtipo basal (PEDDI e ELLIS, 2011). Por apresentarem negatividade para os receptores hormonais, assim como para o *HER2*, os TN têm sido muito estudados, pois apresentam prognóstico ruim e não respondem satisfatoriamente ao tratamento hormonal ou ao trastuzumab. Nesse âmbito, é importante que pesquisas sejam direcionadas para encontrar marcadores genéticos que permitam diferenciar mais

precisamente os subtipos de carcinomas mamários, para que seja possível criar um direcionamento mais preciso para o tratamento dessa doença.

A proteína *FOSL1* em conjunto com proteínas da família JUN formam heterodímeros, como por exemplo, o fator de transcrição AP-1, envolvido em diversos processos que levam ao câncer, como a proliferação celular descontrolada, diferenciação, invasão, angiogênese, metástase, atuando ainda em genes relacionados com a hipóxia (WISDOM e VERMA, 1993; SHAULIAN e KARIN, 2002; MILDE-LANGOSCH, 2005).

Kustikova *et al.*, (1998) utilizaram duas linhagens celulares originadas de um mesmo tumor de camundongo, CSML0 e CSML100 para estudar a função do fator de transcrição AP-1 em diversos estágios da progressão tumoral. CSML0 não apresentava capacidade de invasão tanto *in vitro* quanto *in vivo*, enquanto que, a linhagem CSML100 possuía todas as características de um carcinoma agressivo, possuindo alta capacidade de invasão *in vitro* e de metastatização *in vivo*. Em relação às proteínas da família FOS, as linhagens apresentaram muitas diferenças. Na linhagem CSML0, foi observada expressão apenas de c-FOS, enquanto que, na linhagem CSML100 foi encontrada alta expressão proteica de FOSL1 e FOSL2. O mesmo grupo de pesquisa induziu a expressão de FOSL1 na linhagem CSML0, resultando em um potencial elevado de invasão para esta linhagem, indicando assim, que níveis elevados de FOSL1 nas células cancerosas podem levar a um fenótipo tumoral mais agressivo. Em nosso estudo, foi avaliada a alteração do número de cópias do gene *FOSL1* em diferentes subtipos de carcinomas mamários, classificados de acordo com o *status* dos receptores hormonais e da proteína HER2. Foi observado que amostras referentes a tumores TN apresentam maior número de cópias (média de 5,08 cópias) quando comparados com os subtipos de melhor prognóstico (Luminal A e B médias de 2,68 e 3,16 cópias, respectivamente), sendo essa diferença estatisticamente significativa, evidenciando que a alteração do número de cópias é dependente do subtipo tumoral. Quando utilizamos o parâmetro de presença ou ausência de metástase em linfonodos axilares, observamos que ocorreu um aumento do número de cópias em 77% e 65% das amostras analisadas, respectivamente.

Zajchowski *et al.* (2001) utilizaram ensaios de hibridização para analisar o perfil de expressão gênica de 9 linhagens celulares de carcinomas mamários humanos com pouca capacidade de invasão, e 4 linhagens com alta capacidade de

invasão. Foram encontrados 24 genes diferencialmente expressos entre as linhagens, sendo que, dentre eles, *JUN* e *FOSL1* apresentaram-se com elevada expressão nas linhagens com alta capacidade de invasão.

Várias linhagens celulares de câncer de mama humano são estudadas, desde aquelas positivas para RE e que apresentam pouca capacidade de invasão, como a MCF7, como aquelas as negativas para RE e altamente invasivas, como a MDA-MB231. Essas linhagens diferem no padrão de expressão das proteínas da família FOS. Na linhagem MCF7 é observada apenas a expressão de FOSB, enquanto que *FOSL1* é detectada na linhagem MDA-MB231 (PHILIPS *et al.*, 1998) corroborando a hipótese de que esta proteína esteja envolvida em tumores de pior prognóstico, como é o caso dos TN, como observado no presente estudo.

Kharman-Biz *et al.* (2013) analisaram a expressão gênica de *FOSL1* em diferentes subtipos de carcinomas mamários. Tal estudo revelou que a expressão de *FOSL1* em tumores TN é significativamente mais elevada quando comparada com tumores do subtipo luminal, entretanto, a expressão nos tumores TN e os HER2⁺ não apresentaram diferenças significativas. Nossos dados corroboram os dados deste estudo, pois observamos que o aumento do número de cópias do referido gene é dependente do subtipo de tumor, sendo os TN os que apresentam maior ganho de cópias e tal alteração é estatisticamente significativa quando comparada com os tumores dos subtipos luminal A e luminal B.

Outro estudo avaliando a expressão de *FOSL1* nos diferentes subtipos de carcinomas mamários foi realizado por Zhao *et al.* (2014), em que foi observado que os tumores do subtipo basal apresentam-se com elevada expressão de *FOSL1* quando comparados com os demais subtipos (luminal A, luminal B e HER2⁺).

Logullo *et al.* (2011) analisaram a expressão de *FOSL1* utilizando-se de amostras de CDIS e CDI, além de avaliar a diferença de expressão de acordo com parâmetros histopatológicos. Não foram observadas diferenças significativas de expressão de *FOSL1* em CDIS quando avaliados os receptores hormonais e HER2⁺. Em contraste, quando analisadas as amostras de CDI, foi observada elevada expressão de *FOSL1* nos tumores de graus II e III. Em nosso estudo, não observamos diferenças significativas de aumento do número de cópias entre os tumores de grau I e II em relação aos de grau III.

Em nosso estudo encontramos diferenças com significância estatística entre a alteração do número de cópias do gene *FOSL1* e os diferentes subtipos de

carcinomas mamários, em especial para os TN. Em relação aos parâmetros clínico-histopatológicos (presença e ausência de metástase, grau I em relação aos graus II e III, pacientes em pré-menopausa e pós-menopausa) foi observado aumento do número de cópias em todos os grupos, entretanto, as diferenças entre os grupos não foi significativa. Pelo presente estudo e demais estudos da literatura, podemos sugerir que o gene *FOSL1* pode ser um importante biomarcador para a agressividade dos tumores, visto que tumores de mau prognóstico, como é o caso dos TN, apresentam alterações nesse gene, sejam elas de expressão gênica e proteica ou alterações do número de cópias. Sendo assim, mais estudos são necessários para que se tenha um melhor entendimento sobre a completa relação do referido gene na progressão tumoral.

O gene *GSTP1* codifica a enzima GSTP1, envolvida em processos de detoxificação. Sua atuação em tecidos normais ocorre através da catalisação de reações de conjugação com a glutatona reduzida, protegendo as células contra espécies reativas de oxigênio.

Howie *et al.* (1989) realizaram um estudo em que o objetivo era mensurar a expressão proteica das GSTs Pi, Mu, B1 e B2 no citosol de um grupo de 58 amostras de tumores de mama. O grupo constatou que entre as GSTs analisadas, a classe da GST Pi foi a que apresentou maior nível de expressão, com a concentração indo de 30 a 1.100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de proteína no citosol. Quando analisados os níveis de GST Pi em tumores de acordo com o *status* do RE, foi verificado que tumores que apresentam negatividade para este receptor apresentaram níveis mais elevados quando comparado com os positivos. Em relação à idade das pacientes, não houve nenhuma relação entre as diferenças de concentração da proteína em pacientes pré e pós-menopausa. Os dados gerados sugerem que há alguma relação entre o *status* do RE e o elevado nível de GST Pi.

Em nosso estudo, analisamos a alteração do número de cópias do gene *GSTP1* em carcinomas mamários de acordo com seu subtipo, e os dados obtidos resultaram em 72% das amostras apresentando número de cópias normal. Em média, obtivemos 2,32 cópias para o subtipo Luminal A; 2,18 Para Luminal B; 2,12 para o HER2⁺ e 2,75 para os TN. Tal resultado não é estatisticamente significativo, mostrando que não há relação entre alteração do número de cópias e o subtipo tumoral.

Huang *et al.* (2003) por análises de imuno-histoquímica observaram que houve elevada expressão de GSTP1 em 58% das amostras analisadas, sendo encontrada a proteína no núcleo, citoplasma ou ambos. Foi observado ainda que, o risco de recorrência do tumor é 8 vezes maior em pacientes que apresentam positividade para GSTP1 do que nas células tumorais. Em relação ao *status* do receptor de estrogênio, não houve associação entre a elevada expressão da referida enzima e a positividade ou negatividade do receptor. A conclusão é que a positividade de GSTP1 em células tumorais levam a um pior prognóstico, sobrevivência livre da doença menor e maior chance de recorrência da doença, provavelmente pela indução de resistência à determinados quimioterápicos que seriam excessivamente detoxificados.

Polimorfismos no gene *GSTP1* são amplamente estudados. Khabaz (2014) conduziu um estudo para avaliar se polimorfismos neste gene são fatores de risco para as mulheres da Jordânia. O polimorfismo analisado, leva à alteração da isoleucina da posição 105 por uma valina (no éxon 5 do referido gene) (Ile/Val), diminuindo a atividade catalítica da enzima. Em tese, os indivíduos portadores deste alelo ficariam mais desprotegidos frente a determinados metabólitos, que não seriam detoxificados adequadamente. Segundo os dados obtidos no estudo, não há diferenças entre as pacientes que apresentavam o polimorfismo em relação às formas selvagem. Nas amostras de tumor, 58% eram homozigotas para a forma selvagem (Ile/Ile), 40% heterozigotas (Ile/Val) e 2% mutantes (Val/Val). No grupo controle, 58% eram homozigotas para a forma selvagem, 37,5% heterozigotas e 4,2% homozigotas para a forma mutante. Os resultados indicaram que esse polimorfismo parece não afetar o risco que as mulheres da Jordânia têm de apresentar a doença. Ünlü *et al.* (2008) já haviam realizado um estudo que gerou dados semelhantes, e o mesmo polimorfismo estudado apresentou-se de forma similar entre o grupo teste e o grupo controle.

Torresan *et al.* (2008) realizaram uma análise do mesmo polimorfismo, com 102 amostras casos e 102 controles, de Euro-descendentes do Sul do Brasil. Neste estudo foi observada uma associação positiva entre o polimorfismo Ile/Val e o risco de câncer de mama.

Outros estudos se fazem necessários para um melhor entendimento da participação dessa enzima em tumores de mama, visto que, os resultados mostram-se conflitantes.

O gene *CCND1* codifica a proteína ciclina D1, envolvida em importantes etapas da regulação do ciclo celular, controlando a transição entre as fases G1/S.

Diversos estudos já avaliaram alterações deste gene, no nível transcricional e protéico, constatando que alterações no mesmo contribuem para a carcinogênese.

Burandt *et al.*, (2014) analisaram a amplificação do gene *CCND1* (por FISH) em 147 pacientes com carcinomas primários de mama através de *Tissue Microarray* TMA especificamente manufaturado para acessar a heterogeneidade tumoral. Destas amostras, 14 não foram analisadas por falta de informação de hibridização. Foi observada amplificação em 28 de 133 tumores (21,05%) associada com alto grau tumoral mas não com o tipo, estágio ou expressão de receptores hormonais. Dentre estes, 14 apresentaram alto nível de amplificação gênica, apresentando mais que 10 cópias do gene por célula e 14 com baixa amplificação (2 – 10 cópias de *CCND1* por célula). O alto grau de homogeneidade na amplificação de *CCND1* vista neste estudo sugere que esta alteração é um evento precoce no desenvolvimento dos tumores.

Em nosso estudo, avaliamos a alteração do número de cópias do gene *CCND1* de acordo com os subtipos de tumores de mama. Analisando todas as 77 amostras utilizadas no estudo, verificamos que 64% apresentaram número de cópias normal, 26% apresentaram ganho e 10% perda, para este gene. Considerando a frequência de ganho de cópias (26%), verificamos que está de acordo com os dados da literatura sobre a porcentagem de pacientes com amplificação deste gene por outros métodos (como FISH, por exemplo), em torno de 10-20%. Ao separarmos pelos subtipos, constatamos 2,3 cópias para o Luminal A; 3,1 para o Luminal B; 1,9 para o HER2⁺ e 2,52 para os TN. A alteração do número de cópias entre os subtipos não foi estatisticamente significativa. As análises baseadas nos parâmetros clínicos e histopatológicos não mostraram diferenças significativas para este gene. Também neste aspecto, corroboramos a sugestão de Burandt *et al.* (2014) de que este seja um evento precoce na carcinogênese mamária, e, portanto, presente em todos os subgrupos. Maia (2014) avaliou a expressão gênica e proteica de *CCND1* em tumores metastáticos e não metastáticos e observou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos analisados, indo ao encontro da nossa hipótese de que este gene esteja envolvido na iniciação tumoral.

Mu *et al.* (2011) avaliaram a correlação entre a amplificação de *CCND1* e a deleção de *CHK1* em tumores de mama, utilizando a técnica de FISH. Os dados

gerados por esse trabalho mostraram amplificação do *CCND1* em 16 dos 61 (26,2%) carcinomas analisados. A alteração do número de cópias, quando verificada relação ao grau histológico e o *status* do RE foram significativas, sendo mais frequente o ganho de cópias nos tumores com grau histológico mais elevado e RE positivo. Em relação ao *CHK1*, foi observada a deleção do mesmo, em 18 das 61 amostras (29,5%), não sendo observada correlação estatística com os parâmetros histopatológicos. Pelos resultados obtidos por este grupo de pesquisa, verificou-se que o ganho de cópias do *CCND1* e a deleção do *CHK1* são eventos comuns no câncer de mama e que essas alterações genéticas coexistem. Ao contrário de Burandt *et al.* (2014) e da nossa própria sugestão, este grupo sugere que a deleção do *CHK1* seja um evento envolvido na iniciação do tumor, enquanto a amplificação do *CCND1* esteja mais envolvido com a progressão tumoral.

Kirkegaard *et al.*, (2008) em um estudo conduzido para avaliar as alterações genéticas nos genes *CCND1* e *EMSY* através da técnica de FISH, verificaram amplificação em 14,8% dos casos (17/115) e 7,2% (8/111). Das 17 amostras que apresentaram ganho de cópias para o gene *CCND1*, 14 eram positivas para RE, e 3 negativas. A média de cópias para as amostras que apresentaram amplificação foi de 3,09 cópias. A deleção do referido gene ocorreu em 8,7% dos casos (10/115), sendo 6 positivas para o RE e 4 negativas.

Tais resultados obtidos da literatura são corroborados pelos nossos dados referentes à frequência com que o ganho de cópias do gene *CCND1* ocorre em carcinomas mamários. No entanto, o nosso foco principal foi avaliar se a alteração do número de cópias é um diferencial entre os subtipos de tumores de mama, e nesse contexto, não observamos alterações significativas.

Os genes *FOSL1*, *GSTP1* e *CCND1* estão localizados na região cromossômica 11q13, sendo esta frequentemente amplificada em carcinomas mamários. Pelos dados gerados em nosso estudo, verificamos que o gene *FOSL1* é o que apresenta maior ganho do número de cópias nos carcinomas mamários (70%), e ainda, que tal alteração é mais acentuada em tumores de mau prognóstico, como é o caso dos TN. Para os genes *GSTP1* e *CCND1* houve ganho do número de cópias em 23% e 26%, respectivamente, no entanto, não foi encontrada diferença entre os subtipos analisados. Pelos dados obtidos, podemos sugerir ainda que apesar da região 11q13 estar frequentemente amplificada em carcinomas mamários,

caracterizando um único *amplicon*, o ganho de cópias do gene *FOSL1* ocorreu de forma independente em relação aos genes *GSTP1* e *CCND1*.

Em relação aos parâmetros clínico e histopatológico, não foram evidenciadas alterações significativas.

8 CONCLUSÃO

- Dos três genes analisados, somente o número de cópias de *FOSL1* foi capaz de diferenciar o subtipo TN dos Luminais A e B. Para a corroboração de *FOSL1* como potencial marcador dos tumores TN é importante a avaliação do número de cópias em amostras maiores.
- Nesta amostra, o número de cópias de *FOSL1*, *GSTP1* e *CCND1* não se mostrou associado com os fatores clínicos e histopatológicos, não apresentando, portanto, capacidade de discriminação entre estes grupos.
- A alteração do número de cópias de *FOSL1* ocorreu de forma independente dos demais genes.

REFERÊNCIAS

ADISESHAIAH, P.; PAPAIAHGARI, S. R.; VUONG, H.; KALVAKOLANU, D. V.; REDDY, S. P. Multiple cis-Elements Mediate the Transcriptional Activation of Human *fra-1* by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate in Bronchial Epithelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 48, 2003.

ADISESHAIAH, P.; PEDDAKAMA, S.; ZHANG, Q.; KALVAKOLANU, D. V.; REDDY, S. P. Mitogen regulated induction of *FRA-1* proto-oncogene is controlled by the transcription factors binding to both serum and TPA response elements. **Oncogene**, v. 24, 2005.

ALIZART, M.; SAUNUS, J.; CUMMINGS, M.; LAKHANI, S. R. Molecular classification of breast carcinoma. **Diagnostic Histopathology**, v. 18, n. 3, p. 97–103, 2012.

ALTUCCI, A. R.; CICATIELLO, L.; DAUVOIS, S.; PARKER, MG.; TRUSS, M.; BEATO, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; WEISZ, A. 17 β -Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36 – p34 complex activation and p105^{rb} phosphorylation during mitogenic stimulation of G₁-arrested human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 12, p. 2315 – 2324, 1996.

ASAKURA, T.; HASHIZUME, Y.; TASHIRO, K.; SEARASHI, Y.; OHKAWA, K.; NISHIHARA, J.; SAKAI, M.; SHIBASAKI, T. Supression of GST-P by treatment with glutathione –doxorubicin conjugate induces potent apoptosis in rat hepatoma cells. **Int J Cancer.**, v. 94, n. 2, p. 171- 177, 2001.

BALDIN, V.; LUKAS, J.; MARCOTE, M. J.; PAGANO, M.; DRAETTA, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. **Genes Dev**, v. 7, n. 5, p. 812 – 821, 1993.

BAMBERGER, A.; METHNER, C.; SCHULTE, H. M.; LÖNING, T.; MILDE-LANGOSCH, K. Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: Association of fosB expression with a well-differentiated receptor-positive tumor phenotype. **International Journal of Cancer**, v. 84, n. 5, p. 533 – 538, 1999.

BASSUK, S. S.; MANSON, J. E. Oral contraceptives and menopausal hormone therapy: relative and attributable risks of cardiovascular disease, cancer, and other health outcomes. **Annals of Epidemiology**, 2014.

BATIST, G.; TULPUL, A.; SINH, B. K.; KATKI, A. G.; MYERS, C. E.; COWAN, K. H. Over-expression of a novel anionic glutathione transferase in multi-drug resistant human breast cancer cells. **J Biol Chem**, v. 261, 1986.

BELGUISE, K.; KERSUAL, N.; GALTIER, F.; CHALBOS, D. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. **Oncogene**, v, 24, p. 1434 – 1444, 2005

BERNARDINI, S.; BERNASSOLA, F.; CORTESE, C.; BALLERINI, S.; MELINO, G.; MOTTI, C.; BELLINCAMPI, L.; LORI, R.; FEDERICI, G. Modulation of GSTP-1 activity by polymerization during apoptosis. **J Cell Biochem.**, v. 77, n. 4, p. 645 – 653, 2000.

BUCKLEY, M. F.; SWEENEY, K. J.; HAMILTON, J. A.; SINI, R. L.; MANNING, D. L.; NICHOLSON, R. I.; deFAZIO, A.; WATTS, C. K.; MUSGROVE, E. A.; SUTHERLAND, R. L. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. **Oncogene**, v. 8, n.8, p. 2127 – 2133, 1993.

BUNZ, F. Principles of Cancer Genetics. Tumor Suppressor genes. Biomedical and Life Sciences, p. 77-124, 2008.

BURANDT, E.; GRÜNERT, M.; LEBEAU, A.; CHOSCHZICK, M.; QUAAS, A.; JÄNICKE, F.; MÜLLER, V.; SCHOLZ, U.; BOKEMEYER, C.; PETERSEN, C.; GEIST, S.; PALUCHOWSKI, P.; WILKE, C.; HEILENKÖTTER, U.; SIMON, R.; SAUTER, G.; WILCZAK, W. Cyclin D1 gene amplification is highly homogeneous in breast cancer. **Breast Cancer**, 2014.

BURSTEIN, H. J. The distinctive nature of HER2 positive breast cancers. **The New England Journal of Medicine**. v. 353, n. 16, p. 1652 – 1654, 2005.

BURSTEIN, H. J.; PRESTRUD, A.; SEIDENFELD, J.; ANDERSON, H.; BUCHHOLZ, T.; DAVIDSON, N.; GELMON, K.; GIORDANO, S.; HUDIS, C.; MALIN, J.; MAMOUNAS, E.; ROWDEN, D.; SOLKY, A.; SOWERS, M.; STEARNS, V.; WINER, E.; SOMERFIELD, M.; GRIGGS, J. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, p. 3784–3796, 2010.

CHUN, J.; POCOCK, B.; JOSEPH, K.A.; EL-TAMER, M.; KLEIN, L.; SCHNABEL, F. Breast Cancer Risk Factors in Younger and Older Women. **Ann Surg Oncol**, v. 16, p. 96-99, 2009.

DOISNEAU-SIXOU, S. F.; SERGIO, C. M.; CARROL, J. S.; HUI, R.; MUSGROVE, E. A.; SHUTERLAND, R. L. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. **Endocrine-Related Cancer**, v. 10, p. 179 – 186, 2003.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes Dev**, v. 12, n. 15, p. 2245 – 2262, 1998.

EHEMAN, C.R.; SHAW, K.M.; RYERSON, A.B.; MILLER, J.W.; AJANI, U.A.; WHITE, M.C. The Changing Incidence of In situ and Invasive Ductal and Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 6, p. 1763-1769, 2009.

EROLE, P.; BOSCH, A.; PÉREZ-FIDALGO, J. A.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

FOSTER, J. S.; WIMALASENA, J. Estrogen regulates activity of cyclin-dependent kinases and retinoblastoma protein phosphorylation in breast cancer cells. **Molecular Endocrinology**, v. 10, p. 488 – 498, 1996.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. **N Engl J Med**. 2010.

GILLET, C.; FANTL, V.; SMITH, R.; FISHER, C.; BARTEK, J.; DICKSON, C.; BARNES, D.; PETERS, G. Amplification and Overexpression of Cyclin D1 in Breast Cancer Detected by Immunohistochemical Staining. **Cancer Research**, v.54, p. 1812 – 1817, 1994.

GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>, 2012. Acessado em Setembro de 2014.

GOLDHIRSCH, A; WOOD, W. C.; COATES, A S.; GELBER, R. D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H. J. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of

Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–47, 2011.

GOTO, S.; KAWAKATSU, M.; IZUMI, S.; URATA, Y.; KAGEYAMA, K.; IHARA, Y.; KOJI, T.; KONDO, T. Glutathione S-transferase pi localizes in mitochondria and protects against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 46, n. 10, 2009.

GRUDA, M. C.; KOVARY, K.; METZ, R.; BRAVO, R. Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblast and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. **Oncogene**, v. 9, 1994.

GUIMARÃES, J.R. Manual de oncologia. 3ª ed. São Paulo: Libbs Farmacêutica, 2008.

HAAG, T.; HERKT, C. E.; WALESCH, S. K.; RICHTER, A. M.; DAMMANN, R. H. The apoptosis associated tyrosine kinase gene is frequently hypermethylated in human cancer and is regulated by epigenetic mechanism. **Genes & Cancer**. v. 5, 2014.

HALAZONETIS, T. D.; GEORGOPOULOS, K.; GREENBERG, M. E.; LEDER, P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. **Cell**, v. 55, n. 5, 1988.

HARRIS, L.; FRITSCH, H.; MENNEL, R.; NORTON, L.; RAVDIN, P.; TAUBE, S.; SOMERFIELD, M.; HAYES, D.; BAST JR, R. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 25, p. 5287–5312, 2007

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzyme to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 30, n. 6. 1995.

HICKS, D. G.; SHORT, S. M.; PRESCOTT, N. L.; TARR, S. M.; COLEMAN, K. A.; YODER, B. J.; CROWE, J. P.; CHOUERI, T. K.; DAWSON, A. E.; BUDD, G. THOMAS.; TUBBS, R. R.; CASEY, G.; WEIL, R. J. Breast Cancer With Brain Metastases are More Likely to be Estrogen Receptor Negative, Express the Basal Cytokeratin CK5/6, and Overexpress HER2 or EGFR. **American Journal of Surgical Pathology**. v. 30, n. 9, p. 1097 – 1104. 2006.

HOLLAND, D. G.; BURLEIGH, A.; GIT, A.; GOLDGRABEN, M. A.; PEREZ-MANCERA, P. A.; CHIN, SUET-FEUNG.; HURTADO, A.; BRUNA, ALEJANDRA.; ALI, H. R.; GREENWOOD, W.; DUNNING, M. J.; SAMARAJIWA, S.; MENON, S.; RUEDA, O. M.; LYNCH, A. G.; McKINNEY, S.; ELLIS, I. O.; EAVES, C. J.; CARROL, J. S.; CURTIS, C.; APARICIO, S.; CALDAS, C. ZNF703 is a common Luminal B breast cancer oncogene that differentially regulates luminal and basal progenitors in human mammary epithelium. **Molecular Medicine**, v. 3, p. 167 – 180, 2011.

HOLM, K.; STAAF, J.; JÖNSEN, G.; VALLON-CHRISTERSSON, J.; GUNNARSSON, H.; ARASON, A.; MAGNUSSON, L.; BARKARDOTTIR, R. B.; HEGARDT, C.; RINGNÉR, M.; BORG, A. Characterisation of amplification patterns and target genes at chromosome 11q13 in *CCND1* amplified sporadic and familial breast tumours. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 2, p. 583 – 594, 2012.

HOWELL, A.; ANDERSON, A. S.; CLARKE, R. B.; DUFFY, S. W.; EVANS, D. G.; GARCIA-CLOSAS, M.; GESCHER, A. J.; KEY, T. J.; SAXTON, J.M.; HARVIE, M. N. Risk determination and prevention of breast cancer. **Breast Cancer Research**. v.16, n.5, 2014.

HOWIE, A. F.; MILLER, W. R.; HAWKINS, R. A.; HUTCHINSON, A. R.; BECKETT, G. J. Expression of glutathione s-transferase B1, B2, Mu and pi in breast cancers and their relationship to oestrogen receptor status. **Br j Cancer**. v. 60, n. 6. 1989.

HUANG, J.; TAN, P.; THIYAGARAJAN, J.; BAY, B. Prognostic Significance of Glutathione S-transferase pi in Invasive Breast Cancer. **The United States and Canadian Academy of Pathology**. v. 16, n. 6. 2003.

HUI, R.; BALL, J. R.; MACMILLAN, R. D.; KENNY, F. S.; PRALL, O. WJ.; CAMPBELL, D. H.; CORNISH, A. L.; McCLELLAND, R. A.; DALY, R. J.; FORBES, J. F.; BLAMEY, R. W.; MUSGROVE, E. A.; ROBERTSON, J. FR.; NICHOLSON, R. I.; SUTHERLAND, R. L. *EMS1* gene expression in primary breast cancer: relationship to cyclin D1 and oestrogen receptor expression and patient survival. **Oncogene**, v. 17, n. 8, p. 1053 – 1059, 1998.

HUI, R.; CAMPBELL, D. H.; LEE, C. SL.; McCAUL, K.; HORSFALL, D. J.; MUSGROVE, E. A.; DALY, R. J.; SESHADRI, R.; SUTHERLAND, R. L. *EMS1* amplification can occur independently of *CCND1* or *INT-2* amplification at 11q13 and may identify different phenotypes in primary breast cancer. **Oncogene**, v. 15, n. 13, p. 1617 – 1623, 1997

HURD, T. W.; CULBERT, A. A.; WEBSTER, K. J.; TAVARES, J. M.; Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 transcription and phosphorylation. **Biochem J.** v. 368, p. 573 – 580, 2002.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2014: Incidências de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2014. Acessado em março de 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Abc do câncer – Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2012

IQBAL, N.; IQBAL, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. **Molecular Biology International**, 2014.

JIANG, W.; KAHN, S.M.; TOMITA, N.; ZHANG, Y. J.; LU, S. H.; WEINSTEIN, I. B. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. **Cancer Res**, v. 52, n. 10, p. 2980 – 2983, 1992.

KALLIONIEMI, O. P.; KALLIONIEMI, A.; KURISU, W.; THOR, A.; CHEN, L. C.; SMITH, H. S.; WALDMAN, F. M.; PINKEL, D.; GRAY, J. W. *ERBB2* amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 89, n. 12, p. 5321 – 5325, 1992

KHABAZ, M. N. Polymorphism of the Glutathione S-Transferase P1 gene (GST-Pi) in breast carcinoma. **Polish Journal of Pathology**, v. 65, n. 2, p. 141-146, 2014.

KHARMAN-BIZ, A.; GAO, H.; GHASVAND, R.; ZHAO, C.; ZENDEHDEL, K.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Expression of activator protein-1 (AP-1) family members in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 13, n. 441, 2013.

KIM, M. J.; RO, J. Y.; AHN, S. H.; KIM, H. H.; KIM, S. B.; GONG, G. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparasion with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. **Hum Pathol**, v. 37, n. 9, p. 1217 – 1226, 2006.

KIRKEGAARD, T.; NIELSEN, K. V.; JENSEN, L. B.; CAMPBELL, F. M.; MÜLLER, S.; TOVERY, S. M.; BROWN, S.; COOKE, T. G.; BARTLETT, J. M. Genetic alteration of CCND1 and EMSY in breast cancers. **Histopathology**, v. 52, n. 6, p. 698 – 705, 2008.

KOPNIN, B. P. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry*, v. 25, n° 1, p. 2-27, 2000.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 68, p. 820-823, 1971.

KUSTIKOVA, O.; KRAMEROV, D.; GRIGORIAN, M.; BEREZIN, V.; BOCK, E.; LUKANIDIN, E.; TULCHINSKY, E. Fra-1 Induces Morphological Transformation and Increases In Vitro Invasiveness and Motility of Epithelioid Adenocarcinoma Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 12, p. 7095 – 7105, 1998.

LIU, LC.; SU, CH.; WANG, HC.; CHANG, WS.; TSAI, CH.; MAA, MC.; TSAI, CH.; TSAI, FJ.; BAU, DT. Contribution of personalized Cyclin D1 genotype to triple negative breast cancer risk. **Biomedicine**, v. 4, n. 3, 2014.

LOGULLO, A. F.; STIEPCICH, M. M. A.; OSÓRIO, C. A. B. T.; NONOGAKI, S.; PASINI, F. S.; ROCHA, R. M.; SOARES, F. A.; BRENTANI, M. M. Role of Fos-related antigen 1 in the progression and prognosis of ductal breast carcinoma. **Histopathology**, v. 58, p. 617 – 625, 2011.

LOI, S. Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers – What have we learnt? **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 2813 –2818, 2008.

MAIA, L. B. L. **Análise da Expressão Gênica e Proteica de CCND1 em Carcinomas Primários de Mama**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MARCHIÒ, C.; NATRAJAN, R.; SHIU, K. K.; RODRIGUEZ-PINILA, S. M.; TAN, D. S.; LORD, C. J.; HUNGERMANN, D.; FENWICK, K.; TAMBER, N.; MACKAY, A.; PALACIOS, J.; SAPINO, A.; BUERGER, H.; ASHWORTH, A.; REIS-FILHO, J. S.; The genomic profile of Her2-amplified breast cancers: The influence of ER status. **J. Pathol**, 216: 399-407, 2008.

MATSUSHIME, H.; QUELLE, D. E.; SHURTLEFF, S. A.; SHIBUYA, M.; SHERR, C.J.; KATO, J. Y. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. **Mol Cell Biol.**, v. 14, n.3, p. 2066-2076, 1994.

McDONELL, D. P.; NORRIS, J. D. Connections and Regulation of the Human Estrogen Receptor. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1642 – 1644, 2002.

MICHALIDES, R.; HAGEMAN, P.; VAN TINTEREN, H.; HOUBEN, L.; WIENTJENS, E.; KLOMPMAKER, R.; PETERSE, J. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. **Br J Cancer**, v. 73, n. 6, p. 728 – 734, 1996.

MILDE-LANGOSCH, K. The Fos Family of Transcription Factors and their role in tumorigenesis. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 2449 – 2461, 2005.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 9-41, 2003.

MOTOKURA, T.; BLOOM, T.; KIM, H. G.; JÜPPNER, H.; RUDERMAN, J. V.; KRONENBERG, H. M.; ARNOLD, A. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. **Nature**, v. 350, p. 512 – 515, 1991.

MUSGROVE, E. A.; LEE, C. S.; BUCKLEY, M. F.; SUTHERLAND, R. L. Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n.17, p. 8022 – 8026, 1994.

MU, K.; LI, L.; YANG, Q.; ZHANG, T.; PENG, G.; MENG, B.; LIU, Z.; WANG, Y.; ZHOU, G. Detection of *CHK1* and *CCND1* gene copy number changes in breast cancer with dual-colour fluorescence *in situ* hybridization. **Histopathology**, v. 58, p. 601 – 607, 2011.

NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 7th ed.: Elsevier, 2007.

OLDENBURG, R.A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? Critical Reviews in **Oncology/Hematology**, v. 63, p. 125-149, 2007.

OLSZEWSKI, W.; CHMIELIK, E.; RYS, J. Pathomorphological selection of patients to systemic therapy. **Pol J Pathol**, v. 4, p. 28–33, 2011.

ORMANDY, C. J.; MUSGROVE, E. A.; HUI, R.; DARLY, R. J.; SUTHERLAND, R. L. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.78 p. 323-335, 2003.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potencial Diagnostic and Therapeutic Applications. **The Oncologist**, v.9, p.361-377, 2004.

PEDDI, P. F.; ELLIS, M. J.; MA, C. Molecular Basis of Triple Negative Breast Cancer and Implications for Therapy. **International Journal of Breast Cancer**. 2011.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747 – 752, 2000.

PHILIPS, A.; TEYSSIER, C.; GALTIER, F.; RIVIER-COVAS, C.; REY, J.; ROCHEFORT, H.; CHALBOS, D. FRA-1 Expression Level Modulates Regulation of Activator Protein-1 Activity by Estradiol in Breast Cancer Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 12, n. 7, 1998.

PRALL, O.W.; SARCEVIC, B.; MUSGROVE, E. A.; WATTS, C.K.; SUTHERLAND, R. L. Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G₁-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E- Cdk2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, 1997.

QUELLE, D. E.; ASHMUN, R. A.; SHURTLEEF, S. A.; KATO, J. Y.; BAR-SAGI, D.; ROUSSEL, M. F.; SHERR, C. J. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblast. **Genes Dev**, v. 7, n. 8, p. 1559 – 1571, 1993.

RAJAMOHAN, S. B.; REDDY, S. P. FOSL1 (FOS-like antigen 1). **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**, v, 17, n. 5, 2013.

RAVIKUMAR, G.; ANANTHAMURTHY, A. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters. **J Can Res Ther**, v. 10, n.3, p. 671-675, 2014.

REIS-FILHO, J. S.; PUSZTAI, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and predction. **The Lancet**. v. 378, 2011.

RIESE, D. J.; STERN, D. F.; Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling networks. **BioEssays**, vol. 20, p. 41 – 48, 1998.

RYSECK, R. P.; BRAVO, R. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effects of FOS proteins. **Oncogene**, v. 6, n. 4, 1991.

RODY, A.; KARN, T.; LIEDTKE, C.; PUSZTAI, L.; RUCKHAEBERLE, E.; HANKER, L.; GAETJE, R.; SOLBACH, C.; AHR, A.; METZLER, D.; SCHMIDT, M.; MÜLLER, V.; HOLTRICH, U.; KAUFMANN, M. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. **Breast Cancer Research**. v. 13. 2011.

ROSENBERGER, S. F.; FINCH, J. S.; GUPTA, A.; BOWDEN, G. T. Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 mediated Phosphorylation of JunD and FosB Is Required for Okadaic Acid-induced Activator Protein 1 Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 2, 1999.

ROSSOUW, J. E.; MANSON, J. E.; KAUNITZ, A. M.; ANDERSON, G. L. Lessons Learned From the Women's Health Initiative Trials of Menopausal Hormone Therapy. **Obstet Gynecol**. v. 121, n. 1, p. 172 – 176, 2013.

ROY, P. G.; THOMPSON, A. M. Cyclin D1 and breast cancer. **The Breast**, v. 15, p. 718 – 717, 2006.

SANDHU, R.; PARKER, J. S.; JONES, W. D.; LIVASY, C. A.; COLEMAN, W. B. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. **Lab Medicine**. v. 41, n. 6, 2010.

SCHUURING, E.; VERHOEVEN, E.; MOOI, W. J.; MICHALIDES, R. J. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. **Oncogene**, v. 7, n. 2, p. 355 – 361, 1992.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**, v. 4, 2002.

SILVERSTRINI, R.; VENERONI, S.; BENINI, E.; DAIDONE, M. G.; LUISI, A.; LEUTNER, M.; MAUCIONE, A.; KENDA, R.; ZUCALI, R.; VERONESI, U. Expression of p53, Glutathione S-transferase pi, and Bcl-2 Proteins and Benefit From Adjuvant Radiotherapy in Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 89, n. 9. 1997.

SORLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J.C.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D.; LONNING, P.E.; BORRESEN-DALE, A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 10869-10874, 2001.

TERRIER, P.; TOWNSEND, A. J.; COINDRE, J.M, TRICHE, T. J.; COWAN, K. H. An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal tissue. **Am J Pathol**, v. 137, p. 845 – 853, 1990.

TLSTY, T.D.; CRAWFORD, Y.G.; HOLST, C.R.; FORDYCE, C.A.; ZHANG, J.; MCDERMOTT, K.; KOZAKIEWICZ, K.; GAUTHIER, M.L. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells May Mimic Early Events in Carcinogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 9, n. 3, 2004.

TOMASKOVIC-CROOK, E.; THOMPSON, E. W.; THIERY, J. P. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. **Breast Cancer Research**. v.11, n.6, 2009.

TORRESAN, C.; OLIVEIRA, M. M. C.; TORREZAN, G. T.; OLIVEIRA, S. F. V.; ABUÁZAR, C. S.; GUEMBAROVSKI, R. L.; LIMA, R. S.; URBAN, C. A.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, E. M. S. F. Genetic polymorphism in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, p. 65 – 71, 2008.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, p. 7369 – 7375, 2003.

TNM Classification of Malignant Tumours. 7th Ed. 2009.

TULCHINSKY, E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. **Histology and Histopathology**, v. 15, n. 3, 2000.

TURNER, N. C.; REIS-FILHO, J. S.; Tackling the Diversity of Triple-Negative Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**. v. 19. 2013.

ÜNLÜ, A.; ATES, N. A.; TAMER, L.; ATES, C. Relation of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 genotypes and breast cancer risk. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, p. 643 – 647, 2008.

van DAM, H.; CASTELLAZZI, M. Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis. **Oncogene**, v. 20, 2001.

VECANOVA, J.; HODOROVA, J.; MIHALIK, J.; BENICKY, M.; KLUCHOVA, D.; RYBAROVA, S. Immunohistochemical evaluation of Pi class glutathione S-transferase expression in invasive breast carcinoma. **Bratislava Medical Journal**, v. 112, n. 2, 2011.

WATTS, CK.; BRADY, A.; SARCEVIC, B.; deFAZIO, A.; MUSGROVE, EA.; SUTHERLAND, R. L.; Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation. **Molecular Endocrinology**, v. 9, p. 1804 – 1813, 1995.

WEINSTAT-SASLOW, D.; MERINO, M. J.; MANROW, R. E.; LAWRENCE, J. A.; BLUTH, R. F.; WITTENBEL, K. D.; SIMPSON, J. F.; PAGE, D. L.; STEEG, P. S. Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinoma from non-malignant lesions. **Nat Med**, v. 1, n. 12, p. 1257 – 1260, 1995.

WISDOM, R.; VERMA, I. M. Transformation by fos proteins requires C-terminal transactivation domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n.12, 1993

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer Control Programme. Disponível em <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acessado em Setembro de 2014.

YOUNG, M. R.; COLBURN, N. H. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. **Gene**, v. 379, p. 1 – 11, 2006.

ZAJCHOWSKI, D. A.; BARTHOLDI, M. F.; GONG, Y.; WEBSTER, L.; LIU, H.; MUNISHKIN, A.; BEAUHEIM, C.; HARVEY, S.; ETHIER, S. P.; JOHNSON, P. H. Identification of Gene Expression Profiles That Predict the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 61, p. 5168 – 5178, 2001.

ZHAO, C.; QIAO, Y.; JONSSON, P.; WANG, J.; XU, L.; ROUHI, P.; SINHA, I.; CAO, Y.; WILLIAMS, C.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Genome-wide profiling of AP-1-regulated transcription provides insights into the invasiveness of triple-negative breast cancer. **Cancer Research**, v. 74, n. 14, 2014.

ZUKERBERG, L. R.; YANG, W. I.; GADD, M.; THOR, A. D.; KOERNER, F. C.; SCHMIDT, E. V.; ARNOLD, A. Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast

cancer : approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. **Mod Pathol.**, v. 8, n. 5, p. 560 – 567, 1995.

APÊNDICE

Artigo a ser submetido

Copy number alterations on 11q13 region: *FOSL1* as a potencial marker of more aggressive subgroups.

Leandro Tamião Rodrigues Serino^a, Stephanie Bath de Moraes^a, Cíntia Callegari Coêlho Fernandes^a, Rubens Silveira de Lima^b, Cícero Andrade Urban^b, Iglênir João Cavalli^a, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro^a

^aLaboratory of Human Cytogenetics and Oncogenetics, Genetics Department, Federal University of Parana, 81531-980, Curitiba, Parana, Brazil

^bDepartment of Oncology and Breast Surgery, Hospital Nossa Senhora das Graças Alcidez Munhoz st., 433, 80810-040, Curitiba, Parana, Brazil

Abstract

The differentiation of tumor subtypes of breast carcinomas is of great prognostic importance and in the design of treatments. The *FOSL1*, *GSTP1* and *CCND1* genes located in the region 11q13 is amplified in these carcinomas, and have been identified as target genes for tumor initiation and progression. We analyzed the change in the number of copies (*TaqMan® Copy Number Assay Life Technologies™*) of these genes according to subtypes of 77 breast tumors, subdividing the tumors in subtypes Luminal A (26), Luminal B (29), HER2⁺ (10) and triple-negative (12). Through Kruskal-Wallis test, we found that *FOSL1* was the only one that showed a statistically significant difference ($p < 0.0001$) among tumor subtypes, with more copies in triple-negatives tumors compared to luminal A and B. By linear regression test, we found that the change in the number of copies of this gene is dependent on the tumor subtype ($b = 0.79 \pm 0.20$; $t = 3.95$; $p < 0.001$). Copy number alteration according to the clinical and histopathological parameters showed no statistically significant differences for any of the genes. In conclusion copy number alterations in *FOSL1* suggest that this gene may be a potential prognostic marker and for the differentiation and tumor subtypes.

Keywords: Breast Cancer. *FOSL1*, *GSTP1*, *CCND1*. Tumor subtype. DNA copy number.

Introduction

Breast cancer is the highest incidence cancer between women worldwide, both in developing countries as in developed. About 50% of cases and 58% of deaths occur in less developed countries. The incidence varies widely around the world, with rates of 19.3 new cases per 100,000 women in East Africa up to 89.7 new cases per 100,000 women in Western Europe (GLOBOCAN, 2012). In Brazil, the estimate is nearly 56 cases per 100,000 women (INCA, 2014). Most deaths from this disease occur in low- and middle-income countries due to patients being diagnosed in advanced stages (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Perou *et al.* (2000) using microarray expression, classified the mammary tumors in four groups: luminal, basal, *HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)* positive and normal-like. Subsequent studies subdivided the luminal subgroups into two (Luminal A and Luminal B), because they have distinct gene expression and different clinical behaviors, and new subgroups as HER2 enriched, claudin and low molecular apocrine were described (FARMER *et al.* 2005; PRAT *et al.* 2010; EROLES *et al.* 2012).

Understanding the characteristics and behavior of different subtypes of tumors is of great importance, because from this information the proper treatments are defined for each case.

Considering costs and the complexity of the analysis of gene expression, a simplified classification based on immunohistochemical analysis has been adopted as routine. This is based primarily on the analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and overexpression of HER2 (GOLDHIRSCH *et al.* 2011). Aiming to investigate new markers that differentiate more effectively subgroups classified by immunohistochemistry, we investigate the copy number of three genes, *FOSL1*, *GSTP1* and *CCND1* located in chromosome region 11q13, often amplified in tumors, including breast cancer.

The *FOSL1* gene belongs to the FOS family, composed of members: *FOS*, *FOSB*, *FOSL1* and *FOSL2*. The gene had approximately 8.31 kb and has 4 exons and introns 3.

The proteins encoded by these genes require forming heterodimers with the JUN family members (JUN, JUN-B, JUN-D) to form active transcription complexes (KHARMAN-BIZ *et al.* 2013).

The transcription factor AP-1 (FOSL1 / JUN heterodimer), whose activity is induced by physiological stimuli such as growth factors, cytokines and environmental stress regulates various processes such as cell proliferation, differentiation, metastasis, angiogenesis, apoptosis and stimulating genes associated with hypoxia (WISDOM and VERMA, 1993; SHAULIAN and KARIN, 2002; MILDE-LANGOSCH, 2005).

The gene Glutathione S-transferase pi 1 (*GSTP1*) belongs to the family of Pi class GSTs. The gene has 7 exons and introns 6. In normal tissue, this enzyme protects cells against harmful components, catalyzing conjugation reactions with reduced glutathione and protects cells against reactive oxygen species by reducing organic hydroperoxide through glutathione peroxidase activities (BATIST *et al.* 1986).

High expression of *GSTP1* was observed in cell lines treated with chemotherapy drugs, indicating that this gene is potentially involved in tumor resistance to chemotherapeutic treatments (HAYES and PULFORD, 1995). Resistance to chemotherapy is the main cause leading to the failure of cancer therapies. *GSTP1* being responsible for detoxification processes, it is suggested that its activity can be one of the mechanisms that contribute to drug resistance (HUANG *et al.* 2003).

Cyclin D1 is a protein encoded by the *CCND1* genes that possess 5 exons and introns 4. This protein plays an important role in cell cycle regulation, controlling the transition from the G1 / S (LIU *et al.* 2014).

CCND1 copy gain occurs in about 15 - 20% of breast tumours (GILLETT *et al.* 1994; HUI *et al.* 1997; HUI *et al.* 1998 ORMANDY *et al.* 2003; KIRKEGAARD *et al.* 2008; HOLM *et al.*, 2012). However, cyclin D1 has high protein and mRNA expression in approximately 50% of breast cancers, independent of gene amplification, suggesting that other mechanisms are involved in gene disruption (BUCKLEY *et al.* 1993; GILLETT *et al.* 1994; HOLM *et al.* 2012). According to some researchers, the overexpression of *CCND1* occurs in the ER positive tumors (HUI *et al.* 1997; 1998).

The p16 pathway-cyclin D1-CDK4 is responsible for regulating the transition from the G1-S phase of the cell cycle and changes in pathway components that are found in most tumors (MOTOKURA *et al.* 1991; JIANG *et al.* 1992; SCHUURING *et al.*, 1992). The class D cyclins (D1, D2, D3) bind to CDKs 4 and 6 and phosphorylate various substrates, including the pRb protein (MATSUSHIME *et al.*, 1994). The pRB

phosphorylation results in the release of transcription factors, mainly those belonging to the E2F family, which activate several genes responsible for progression to S phase (DYSON, 1998).

The focus of this study is to compare the copy number change of *FOSL1*, *GSTP1* and *CCND1* between tumor subtypes Luminal A and B, HER2⁺ and triple negative (TN) and the relationship with clinical and histopathological parameters.

Material and methods

Sample Characterization

Seventy-seven samples from primary breast carcinomas were collected during surgery to remove the tumor at the Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba, state of Paraná, south Brazil. The samples were processed at the Laboratory of Human Cytogenetics and Oncogenetics, Genetics Department, Federal University of Parana.

Information regarding the age of patients, histological grade of tumors and presence or absence of metastasis in axillary lymph nodes, as well as immunohistochemical markers were obtained directly from the anatomical and pathological records and reports and are summarized in Table 1. Samples were divided into subtypes Luminal A, Luminal B, HER2⁺ and TN according with the status of hormone receptors and HER2.

Copy number analysis

The DNA from each sample was extracted with phenol-chloroform method, which consists in the use of proteinase K (10 µg/mL) for disaggregation of tissue and subsequently adding 1 volume of phenol: chloroform: isoamyl alcohol 25:24:1 v/v, and precipitation in 2 volumes of absolute ethanol and 0.2 volumes of ammonium acetate 7,5 M. At the end of the process the DNA was precipitated in 1 mL of 70% ethanol and resuspended in 40 µL of ultra pure water. Subsequently the samples were diluted in 5 ng/µL.

To analyse the copy number of the studied genes we used *TaqMan® Copy Number Assays* from *Life Technologies™*. The *RNASE P* was used as reference

gene, and as DNA control a DNA pool of women not diagnosed with breast cancer. For each reaction were used: 5 uL of Master Mix, 2 uL DNA (5 ng / uL), 0.5 uL study gene mix (containing a pair of primers and the TaqMan® probe), 0.5 uL *RNase P* gene mix (primers and TaqMan® probe) and 2 uL of ultra pure water, 10 uL total reaction volume. All samples, including control DNA were analyzed in triplicate in 96 well plates in the *Viiia 7 (Applied Biosystems™)* equipment. PCR conditions include an initial denaturation step at 95 ° C for 10 minutes, then 40 cycles at 95 ° C for 15 seconds and 60 ° C for 1 minute.

Analyses were performed using the Copy Caller software (Life Technologies™). We do not consider the samples presented CT value > 33 cycles and value z-score \geq 2.65. The number of copies of the DNA test was calculated in comparison with control DNA by software that considers gains when the number of copies is calculated in 2.51; or above, loss when is 1.49 or below; and normal when it is between 1.50 and 2.50.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunn using the method for comparison between groups. Statistically significant results were submitted to linear regression analysis. For the tests we used the GraphPad Prism Version 1.6 software for Windows (Available in: www.graphpad.com). We considered as statistically significant p values <0.05.

Results

We found gain in the copy number in all genes analyzed, 70% for *FOSL1*, 23% for *GSTP1* and 26% for *CCND1*.

For the *GSTP1* genes *CCND1* and there was no statistically significant difference between the variations in copy number and tumor subtypes, $p = 0.1130$ and $p = 0.3092$ respectively Figure 1a and 1b. For *FOSL1* gene, we found that the copy number has averaged 2.68 for the Luminal A subtype; 3.16 for Luminal B ; 4.02 for HER2+ and 5.08 for TN tumors $p < 0.0001$. Using the Dunn method, we found that the difference was between tumors TN / Luminal A and TN / Luminal B. There were no significant differences among the other subtypes Figure 1c.

By linear regression test, we found that the change in the number of copies of this gene is dependent on the tumor subtype ($b = 0.79 \pm 0.20$; $t = 3.95$; $p < 0.001$), TN shows the greatest copy number alterations Figure 2.

To evaluate if all three gene copies present gain independently, we perform the χ^2 test ($\chi^2 = 44.36$, $p < 0.001$). We found χ^2 partials values for gene *FOSL1* (17,75 for gain and 11,75 for not gain) representing 67% of total χ^2 .

We did not observe significant differences between the copy number and the clinical and histopathological parameters, such as the presence or absence of metastasis in axillary lymph nodes, tumor grade (I / II vs. III), and patients in pre or post menopause.

Discussion

In our study, we evaluated copy number of *FOSL1*, *GSTP1*, *CCND1* genes in different subtypes of breast carcinomas, classified according to the status of hormone receptors and HER2 protein.

In a gene expression study, Kharman-Biz *et al.* (2013) observed that *FOSL1* expression is higher in TN tumors compared to luminal subtype, however, no significant difference of expression in relation to HER2⁺ subtype was observed. From Kharman-Biz *et al.* (2013) results and our own, we can suggest that the increase of copies of that gene may reflect in increased gene expression, and that these changes occur more frequently in more aggressive tumors and poor prognosis, such as TN. Zhao *et al.* (2014), in a gene expression study found that the basal subtype tumors have high *FOSL1* expression compared to luminal. This result is consistent with what we suggest about changes in that gene and its relationship with the aggressiveness of tumors.

Some studies were performed involving the *FOSL1* expression in different cancer cell lines and the results indicate that strains with high metastatic ability show greater expression of this gene (KUSTIKOVA *et al.* 1998; ZAJCHOWSKI *et al.* 2001).

We suggest that *FOSL1* may be an important biomarker for the aggressiveness of tumors, since tumors of poor prognosis, such as the TN, shows gene expression alteration, copy number or both.

The *GSTP1* gene analyzed in our study had no alteration in copy number in 72% of the samples checked, and 23% had copies number gain. No significant

differences was observed in copy number according with different tumor subtypes and also clinical-pathological parameters.

One possible explanation for the altered activity of this enzyme in breast tumors may be due to polymorphisms in the gene, for example, the polymorphism (Ile105Val) whose Ile homozygous allele increases the enzymatic activity. Studies involving this polymorphism still show conflicting results as Ünlü *et al.* (2008) and Khabaz (2014) studied this polymorphism in women with breast cancer, found no association between the polymorphism and the risk of cancer. However Torresan *et al.* (2008) studying the same polymorphism in patients Euro-descendants in southern Brazil, found a positive association between the Val allele and the risk of breast cancer.

By our results, we can say that this gene has copies gain in about 20% of breast tumors and that there is no difference between the copies gain according to the tumor subtypes and not with clinical and histopathological parameters.

In our study, we found that the *CCND1* gene shows copies gain in 26% of cases. Our data are consistent with the Hui *et al.* (1997, 1998), Kirkegaard *et al.* (2008) and Holm *et al.* (2012) studies that found the amplification of this gene in approximately 15-20% of breast tumors. Copy number changes between subtypes was not statistically significant. Analyses based on clinical and histopathological parameters showed no significant differences for this gene. Based on this, we corroborate the suggestion Burandt *et al.* (2014) that this is an early event in mammary carcinogenesis, and thus present in all subgroups. Unlike Burandt *et al.* (2014) and our own suggestion, Mu *et al.* (2011) suggest that amplification of the *CCND1* are involved with tumor progression. These results obtained from literature are consistent with those of our study related to the frequency with which the copy gain of the *CCND1* gene occurs in breast carcinomas. However, the focus of this study was to evaluate the change in the copy number between the subtypes of breast tumors, and in this context, no significant changes was observed.

Despite *FOSL1*, *GSTP1* and *CCND1* genes are located in the same chromosomal region (11q13), we found an independent variation in copy number between those genes, and do not represent a single amplicon. We found that the *FOSL1* gene is the one with biggest copy number gain in breast carcinomas (70%), and that such change is more apparent in poor prognosis tumors, such as TN. For *GSTP1* and *CCND1* genes was observed copy number gain in 23% and 26% of the

samples, respectively. However, no difference was found between the analyzed subtypes. Thus, we conclude that despite the 11q13 region is frequently amplified in breast carcinoma, copy number gain in *FOSL1* gene occurred as an independent event.

Regarding the clinical and histopathological parameters, we did not observe no significant changes.

Conclusion

We found that the three analyzed genes have gained copies in breast carcinomas. However, only the *FOSL1* gene shows statistically significant differences according to tumor subtype, being TN tumors the ones with the greatest change compared to luminal. In addition, we suggest that the copy number change of this gene occur independently, despite the physical proximity of other genes in the 11q13 region. The frequency of increased number of copies of *GSTP1* and *CCND1* genes is consistent with literature reports but not demonstrated potential discrimination between subgroups. These data put the *FOSL1* gene as an important candidate aggression marker, and the potential to differentiate subgroups of more aggressive breast tumors, requiring studies on larger samples and with more parameters in the standings expression studies in the same sample.

References

BATIST, G.; TULPUL, A.; SINH, B. K.; KATKI, A. G.; MYERS, C. E.; COWAN, K. H. Over-expression of a novel anionic glutathione transferase in multi-drug resistant human breast cancer cells. **J Biol Chem**, v. 261, 1986.

BUCKLEY, M. F.; SWEENEY, K. J.; HAMILTON, J. A.; SINI, R. L.; MANNING, D. L.; NICHOLSON, R. I.; deFAZIO, A.; WATTS, C. K.; MUSGROVE, E. A.; SUTHERLAND, R. L. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. **Oncogene**, v. 8, n.8, p. 2127 – 2133, 1993.

BURANDT, E.; GRÜNERT, M.; LEBEAU, A.; CHOSCHZICK, M.; QUAAS, A.; JÄNICKE, F.; MÜLLER, V.; SCHOLZ, U.; BOKEMEYER, C.; PETERSEN, C.; GEIST, S.; PALUCHOWSKI, P.; WILKE, C.; HEILENKÖTTER, U.; SIMON, R.; SAUTER, G.;

WILCZAK, W. Cyclin D1 gene amplification is highly homogeneous in breast cancer. **Breast Cancer**, 2014.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes Dev**, v. 12, n. 15, p. 2245 – 2262, 1998.

EROLE, P.; BOSCH, A.; PÉREZ-FIDALGO, J. A.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

FARMER, P.; BONNEFOI, H.; BECETTE, V.; TUBIANA-HULIN, M.; FUMOLEAU, P.; LARSIMONT, D.; MACGROGAN, G.; BERGH, J.; CAMERON, D.; GOLDSTEIN, D.; DUSS, S.; NICOULAZ, A. L.; BRISKEN, C.; FICHE, M.; DELORENZI, M.; IGGO, R. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, n. 29, 2005.

GILLET, C.; FANTL, V.; SMITH, R.; FISHER, C.; BARTEK, J.; DICKSON, C.; BARNES, D.; PETERS, G. Amplification and Overexpression of Cyclin D1 in Breast Cancer Detected by Immunohistochemical Staining. **Cancer Research**, v.54, p. 1812 – 1817, 1994.

GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>, 2012. Access in September 2014.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H. J. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–47, 2011.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzyme to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 6. 1995.

HOLM, K.; STAAF, J.; JÖNSEN, G.; VALLON-CHRISTERSSON, J.; GUNNARSSON, H.; ARASON, A.; MAGNUSSON, L.; BARKARDOTTIR, R. B.; HEGARDT, C.; RINGNÉR, M.; BORG, A. Characterisation of amplification patterns and target genes at chromosome 11q13 in *CCND1* amplified sporadic and familial breast tumours. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 2, p. 583 – 594, 2012.

HUANG, J.; TAN, P.; THIYAGARAJAN, J.; BAY, B. Prognostic Significance of Glutathione S-transferase pi in Invasive Breast Cancer. **The United States and Canadian Academy of Pathology**, v. 16, n. 6. 2003.

HUI, R.; BALL, J. R.; MACMILLAN, R. D.; KENNY, F. S.; PRALL, O. W.J.; CAMPBELL, D. H.; CORNISH, A. L.; McCLELLAND, R. A.; DALY, R. J.; FORBES, J. F.; BLAMEY, R. W.; MUSGROVE, E. A.; ROBERTSON, J. FR.; NICHOLSON, R. I.

SHUTERLAND, R. L. *EMS1* gene expression in primary breast cancer: relationship to cyclin D1 and oestrogen receptor expression and patient survival. **Oncogene**, v. 17, n. 8, p. 1053 – 1059, 1998.

HUI, R.; CAMPBELL, D. H.; LEE, C. SL.; McCAUL, K.; HORSFALL, D. J.; MUSGROVE, E. A.; DALY, R. J.; SESHADRI, R.; SUTHERLAND, R. L. *EMS1* amplification can occur independently of *CCND1* or *INT-2* amplification at 11q13 and may identify different phenotypes in primary breast cancer. **Oncogene**, v. 15, n. 13, p. 1617 – 1623, 1997.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2014: Incidências de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. <<http://www.inca.gov.br>>, 2014. Acess in March 2014.

JIANG, W.; KAHN, S.M.; TOMITA, N.; ZHANG, Y. J.; LU, S. H.; WEINSTEIN, I. B. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. **Cancer Res**, v. 52, n. 10, p. 2980 – 2983, 1992.

KHABAZ, M. N. Polymorphism of the Glutathione S-Transferase P1 gene (GST-Pi) in breast carcinoma. **Polish Journal of Pathology**, v. 65, n. 2, p. 141-146, 2014.

KHARMAN-BIZ, A.; GAO, H.; GHIASVAND, R.; ZHAO, C.; ZENDEHDEL, K.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Expression of activator protein-1 (AP-1) family members in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 13, n. 441, 2013.

KIRKEGAARD, T.; NIELSEN, K. V.; JENSEN, L. B.; CAMPBELL, F. M.; MÜLLER, S.; TOVERY, S. M.; BROWN, S.; COOKE, T. G.; BARTLETT, J. M. Genetic alteration of *CCND1* and *EMSY* in breast cancers. **Histopathology**, v. 52, n. 6, p. 698 – 705, 2008.

KUSTIKOVA, O.; KRAMEROV, D.; GRIGORIAN, M.; BEREZIN, V.; BOCK, E.; LUKANIDIN, E.; TULCHINSKY, E. Fra-1 Induces Morphological Transformation and Increases In Vitro Invasiveness and Motility of Epithelioid Adenocarcinoma Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 12, p. 7095 – 7105, 1998.

LIU, LC.; SU, CH.; WANG, HC.; CHANG, WS.; TSAI, CH.; MAA, MC.; TSAI, CH.; TSAI, FJ.; BAU, DT. Contribution of personalized Cyclin D1 genotype to triple negative breast cancer risk. **Biomedicine**, v. 4, n. 3, 2014.

MATSUSHIME, H.; QUELLE, D. E.; SHURTLEFF, S. A.; SHIBUYA, M.; SHERR, C.J.; KATO, J. Y. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. **Mol Cell Biol.**, v. 14, n.3, p. 2066-2076, 1994.

MILDE-LANGOSCH, K. The Fos Family of Transcription Factors and their role in tumourigenesis. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 2449 – 2461, 2005.

MOTOKURA, T.; BLOOM, T.; KIM, H. G.; JÜPPNER, H.; RUDERMAN, J. V.; KRONENBERG, H. M.; ARNOLD, A. A novel cyclin encoded by a *bcl1*-linked candidate oncogene. **Nature**, v. 350, p. 512 – 515, 1991.

MU, K.; LI, L.; YANG, Q.; ZHANG, T.; PENG, G.; MENG, B.; LIU, Z.; WANG, Y.; ZHOU, G. Detection of *CHK1* and *CCND1* gene copy number changes in breast cancer with dual-colour fluorescence *in situ* hybridization. **Histopathology**, v. 58, p. 601 – 607, 2011.

ORMANDY, C. J.; MUSGROVE, E. A.; HUI, R.; DARLY, R. J.; SUTHERLAND, R. L. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.78 p. 323-335, 2003.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747 – 752, 2000.

PRAT, A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; FAN, C.; LIVASY, C.; HERSCHKOWITZ, J. I.; HE, X.; PEROU, C. M.. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. R68, n. 12, p. 1-18, 2010.

SCHUURING, E.; VERHOEVEN, E.; MOOI, W. J.; MICHALIDES, R. J. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in humans carcinomas. **Oncogene**, v. 7, n. 2, p. 355 – 361, 1992.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**, v. 4, 2002.

TORRESAN, C.; OLIVEIRA, M. M. C.; TORREZAN, G. T.; OLIVEIRA, S. F. V.; ABUÁZAR, C. S.; GUEMBAROVSKI, R. L.; LIMA, R. S.; URBAN, C. A.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, E. M. S. F. Genetic polymorphism in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, p. 65 – 71, 2008.

ÜNLÜ, A.; ATES, N. A.; TAMER, L.; ATES, C. Relation of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 genotypes and breast cancer risk. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, p. 643 – 647, 2008.

WISDOM, R.; VERMA, I. M. Transformation by fos proteins requires C-terminal transactivation domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n.12, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer Control Programme. <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acess in September 2014.

ZAJCHOWSKI, D. A.; BARTHOLDI, M. F.; GONG, Y.; WEBSTER, L.; LIU, H.; MUNISHKIN, A.; BEAUHEIM, C.; HARVEY, S.; ETHIER, S. P.; JOHNSON, P. H. Identification of Gene Expression Profiles That Predict the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 61, p. 5168 – 5178, 2001.

ZHAO, C.; QIAO, Y.; JONSSON, P.; WANG, J.; XU, L.; ROUHI, P.; SINHA, I.; CAO, Y.; WILLIAMS, C.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Genome-wide profiling of AP-1-regulated

transcription provides insights into the invasiveness of triple-negative breast cancer.
Cancer Research, v. 74, n. 14, 2014.

Table 1 - Clinical and histopathological information.

	N	Age	Grade (%)	Metastasis in lymph nodes
ER⁺, PR⁺, HER2⁺ (Luminal A)	26	57,3 ± 12,0	Grade I (20%) Grade II (52%) Grade III (28%)	P (52%) A (48%)
ER⁺, PR⁺, HER2⁻ (Luminal B)	29	61,3 ± 18,3	Grade I (12%) Grade II (60%) Grade III (28%)	P (51,9%) A (48,1%)
ER⁻, PR⁻, HER2⁺ (HER2⁺)	10	64 ± 16,3	Grade I (0%) Grade II (33,3%) Grade III (66,7%)	P (70%) A (30%)
ER⁻, PR⁻, HER2⁻ (Triplo-Negativo)	12	51,7 ± 11,0	Grade I (0%) Grade II (50%) Grade III (50%)	P (50%) A (50%)

Legend: (ER) Estrogen receptor (PR) Progesterone receptor (HER2) Human Epidermal growth factor Receptor 2 (N) sample size (P, A) presence, absence of lymph node metastasis.

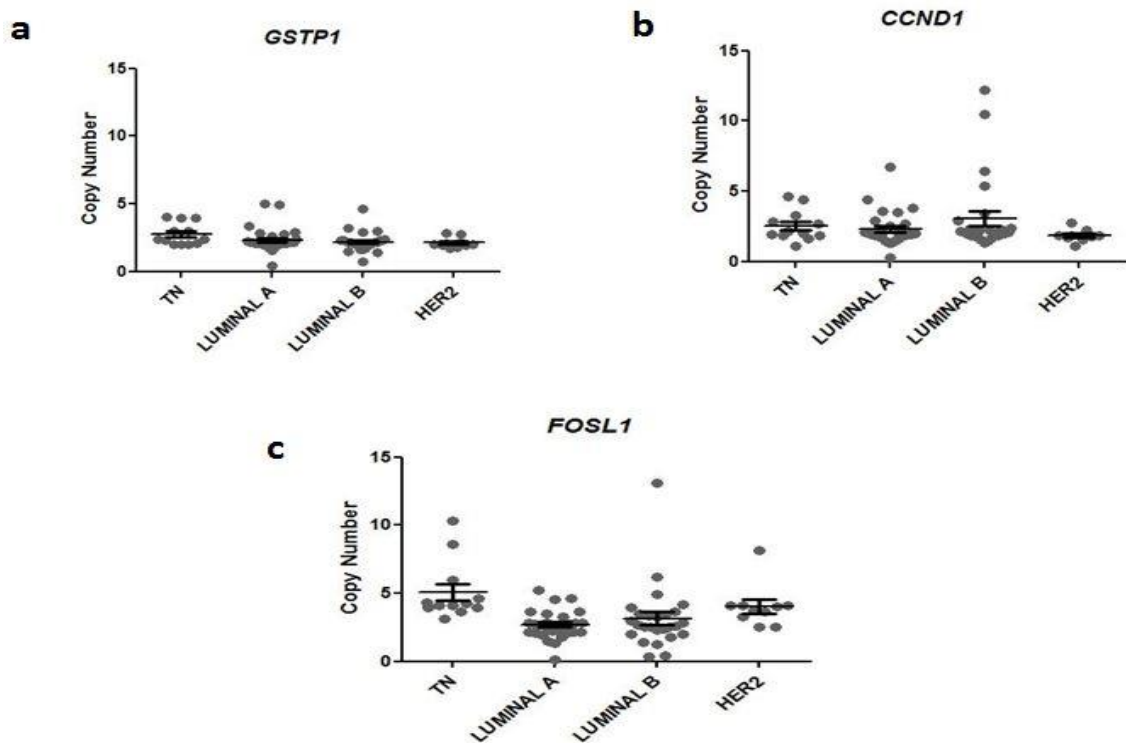


Figure 1 – Copy number changes of *GSTP1*, *CCND1*, and *FOSL1* genes according tumor subtype. **(a)** *GSTP1* (p = 0,1130) **(b)** *CCND1* (p = 0,3092) **(c)** *FOSL1* (p < 0,0001).

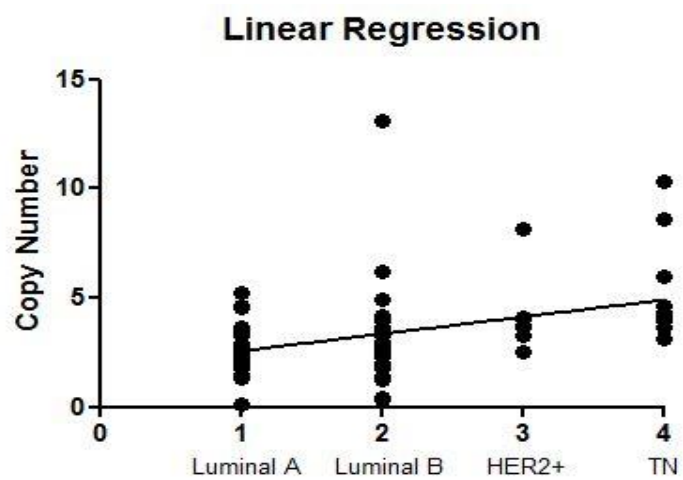


Figure 2 - Distribution of the copy number change of the gene *FOSL1* and linear regression according to subtypes of breast carcinomas.
 Legend: TN (*Triple Negative*).